

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА МОРФОЛОГИЯ, ПАТОЛОГИЯ И
АНТРОПОЛОГИЯ С МУЗЕЙ

ЗДРАВКА ДИМИТРОВА ПЕТРОВА

АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ НА КОМПЛЕКСИ НА
 $Ru(II)(III)$ С ШИФОВИ БАЗИ ПРИ ПОСТОЯННИ И
ПЪРВИЧНИ ТУМОРНИ КЛЕТЪЧНИ КУЛТУРИ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”

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

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Морфология (шифър: 01.06.26)

Научен ръководител:

проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор

София, 2022 г.

Представеният Дисертационен труд е написан на 254 страници и съдържа 106 фигури и 36 таблици. Списъкът на цитираната литература включва 251 заглавия на латиница.

Експерименталната работа е извършена в лабораториите на Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей – БАН.

Комплексите на рутений са синтезирани и физикохимически характеризирани от д-р Даниела-Кристина Кулица и д-р Габриела Маринеску, Институт по физикохимия “Илие Мъргулеску”, Букурещ, Румъния.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за защита на разширено заедание на секция “Патология”, ИЕМПАМ-БАН, проведено със заповед на Директора на ИЕМПАМ-БАН, РД-09-68 от 24.11.2022 г.

Защитата на Дисертационния труд ще се състои на 14.03.2023 г от 11:00 часа в заседателната зала на ИЕМПАМ-БАН (гр.София, ул.”Акад.Г. Бончев”, бл.25) на открито заседание на Научно жури, назначено със заповед №РД-15-166 от 19.12.2022 г на директора на Института, в състав:

Председател на научното жури:

Проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор (ИЕМПАМ - БАН)

Вътрешни членове:

Проф. д-р Ренета Александрова Тошкова, доктор (ИЕМПАМ - БАН) – рецензия

Проф. Радостина Ивайлова Александрова, доктор (ИЕМПАМ - БАН) –
становище

Външни членове

Проф. д-р Рени Емил Калфин, дм (Институт по неврология – БАН) - рецензия

Проф. Иво Коцев Грабчев, дхн (МФ на СУ “Св. Кл.Охридски”) - становище

Проф.д-р Людмила Владимирова Кабаиванова-Миланова (Институт по
микробиология – БАН) - становище

Материалите за защитата се намират на разположение на интересуващите се в Канцеларията на ИЕМПАМ-БАН.

Благодаря на научния си ръководител проф.Радостина Александрова, доктор за предоставената ми възможност да реализирам дългоочакваната от мен експериментална работа в областта на туморната биология и създаването на първични туморни култури.

Изказвам сърдечна благодарност на колегите от ИЕМПАМ-БАН за съвместната работа, сърдечната колегиална подкрепа и ценните методологични и практически напътствия.

Благодаря на ръководството на ИЕМПАМ-БАН – на проф.Светлозара Петкова, проф.д-р Димитър Кадийски, чл.кор.проф.Нина Атанасова и научния секретар доц.д-р Катерина Димитрова за оказаната административна подкрепа и проявеното разбиране.

Огромна благодарност бих искала да изкажа на проф.д-р Ренета Тошкова,доктор за безценните напътствия при обобщаването на получените резултати.

С подчертано внимание искам да благодаря на проф. Иван Гаврилов (УСБАЛ по онкология, гр.София) и д-р Кирчо Патриков, дм (УСБАЛ по ортопедия, гр.София) за предоставените туморни тъкани.

Изказвам специални благодарности на колегите от ИЕМПАМ-БАН – на доц.д-р Катерина Димитрова, доктор за колегиалната подкрепа и изготвянето на електронномикроскопските препарати; на доц. Иван Илиев, доктор за любезно предоставената нетуморна клетъчна линия и безценните съвети в областта на клетъчното култивиране; на доц.д-р Веселин Нанев, доктор и доц. Ивелин Владов, доктор за помощта при изготвянето на флуоресцентни микроскопски изображения; на доц.Ани Георгиева, доктор за ежедневната подкрепа и готовност за професионално съдействие. Искрено благодаря за съвместната работа и подкрепа на лаборантите от секция “Патология” – Светлана Влагова и Здравка Стоичкова. Благодаря на доц.Милена Мурджева, доктор (Институт по биология и имунология на размножаването “Акад.Кирил Братанов” – БАН) за съдействието при изследванията с конфокална микроскопия.

Благодаря на родителите ми за вярата им във всичките ми начинания.

Благодаря на съпруга ми д-р Росен Спасов за безкомпромисното ни професионално сътрудничеството във всички изследвания и безрезервната му лична подкрепа за цялостната реализация на този Дисертационен труд, вдъхновен и посветен на семейството ни.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. Въведение.....	6
2. Цел и задачи.	9
3. Материали и методи.....	10
4. Резултати	
4.1. Експерименти с постоянни клетъчни линии.....	17
4.2. Експерименти с първични туморни култури.....	50
5. Обсъждане.....	62
6. Изводи.....	77
7. Приноси.....	79
8. Научни публикации по темата на дисертацията.....	81
9. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд.....	82
10. Благодарности към научноизследователски проекти.....	85

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

МЛР - Множествена лекарствена резистентност

СЗО - Световната здравна организация

ТСК - Туморни стволови клетки

ЦТК - Циркулиращи туморни клетки

ЦК₅₀ - Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 50% преживяемостта на третираните клетки

ЦК₉₀ - Цитотоксична концентрация на веществото, която намалява с 90% преживяемостта на третираните клетки

ШБ - Шифова база

ТНKG, TNBC – тройно-негативен карцином на гърдата

КОМ - Колонии-образуващ метод

ИХХ - Имунохистохимично изследване

CisPt - Цисплатина

CSCs - Туморни стволови клетки (Cancer Stem Cells)

CTCs - Циркулиращи туморни клетки (Circulating Tumor Cells)

CV - Тест за оцветяване с кристалвиолет

DMSO - Диметилсулфоксид

EDTA - Етилендиаминтетраоцетна киселина

ЕМТ - Епително-мезенхимен преход

ER - Рецептор за естроген (Estrogen Receptor)

FBS - Фетален телешки серум (Fetal Bovine Serum)

HER2 - Рецептор за човешки епидермален растежен фактор 2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)

MDR - Множествена лекарствена устойчивост (Multi Drug Resistance)

МТТ - Тест за цитотоксичност с диметилтиазол-2-5-дифенилтетразолиев бромид

NR – тест за цитотоксичност с включване на неутрално червено

PR - Рецептор за прогестерон (Progesteron Receptor)

PBS – Фосфатно солеви буфер (Phosphate-buffered saline)

RST - Клетъчна линия от плъши саркомни клетки LSR-SR-SR

1. Въведение

През последните години беше постигнат огромен научен напредък в разбирането за ролята на генетиката и имунологията при възникването и еволюцията на малигнените тумори. Новостите в диагностиката и лечението на злокачествените неоплазми значително подобриха преживяемостта и качеството на живот на онкологично болните пациенти. Синергичното съчетание на медицински данни и нови технологии даде начало на развитието на персонализираната медицина, базирана на парадигмата, че всеки тумор има уникален молекулярно-биологичен профил и няма еднакви пациенти. Възможно най-ефективният начин за профилактика и лечение на онкологичните заболявания изисква персонализиран подход, съобразен с характеристиките на пациента и заболяването. Чрез установяването на генетична предразположеност към развитие на ракови заболявания и индивидуална оценка на риска, целенасочената профилактика и персонализираните терапии могат значително да подобрят лечението и прогнозата за онкологично болните пациенти и да намалят риска от неблагоприятни ефекти като се приложат специално разработени стратегии за профилактика и лечение така, че пациентите да получават терапиите, които са най-ефективни за тях, без да се разхищават средства за лечение на принципа на проба-грешка.

Клетъчният състав на туморите е основен фактор, определящ както биологичните, така и клиничните характеристики на заболяването на даден индивид. Голямото вътретуморно клетъчно разнообразие гарантира поне една субпопулация туморни клетки, която е в състояние да понесе променените условия по време на лечението или при преместването им на метастатично място. Като една от най-обещаващите терапевтични цели се откроява идентифицирането на туморни стволови клетки. Те представляват малка клетъчна популация (0.5-1% от тумора) със стволови характеристики. Моделът на туморните стволови клетки (ТСК) предполага, че туморите, както и нормалните тъкани, са организирани в клетъчна йерархия, в която ТСК са единствените клетки с неограничена пролиферация и туморогетен потенциал; следователно са способни да стимулират растежа, прогресията и метастазирането поради характеристиките си, подобни на стволовите клетки - самообновяване и диференциация. ТСК участват във всички етапи от развитието на малигнените неоплазми, включително иницирането и прогресията на първичния тумор, развитието на метастази и рецидивите. Биологичните характеристики на тази клетъчна популация

като туморогенност, ускорено и обратимо преминаване през фазите на епително-мезенхимен преход (ЕМТ), резистентност към химиотерапевтични агенти чрез повишена експресия на ефлуксни транспортери, засилена експресия на антиапоптоични протеини, резистентност към йонизиращо лъчение чрез неутрализиране на свободни кислородни радикали, са причина за увеличен риск от рецидив и метастазиране и лош изход за пациента. Поради това терапевтичното насочване към тях може да бъде от полза за успеха на лечението. Терапевтичните подходи могат да бъдат насочени чрез въздействие върху различни функционални и молекулярни аспекти на ТСК, като клетъчни маркери на стволовост, сигнални пътища, отговорни за самообновяването, взаимодействието между тумора и микросредата и пътищата за лекарствена резистентност, управлявани от ТСК.

През последните години лечението на онкологичните заболявания се насочва към персонализирана терапия. Първичните туморни култури са незаменим модел за изучаване на редица аспекти на туморната биология, отразяващ молекулярните и клетъчните характеристики на оригиналните тумори. Те са отличен модел за тестване на антитуморни препарати, тъй като преодоляват недостатъците на постоянните клетъчни линии и разходите, свързани с използването на животински модели. Първичните туморни култури са ценен инструмент на персонализираната терапия и използването им дава възможност за индивидуално прогнозиране на ползата от различни терапевтични схеми за конкретен пациент. Възможността да се тества ефективността на терапевтичните препарати директно върху тумора на конкретен пациент представлява голяма стъпка към персонализиран подход в медицинската онкология. Получените от тумори на пациенти първични клетъчни култури, ксенографти и органоиди са функционални модели, които представляват пряка реализация на идеята за персонализирана медицина в онкологичната практика. Тези моделни системи могат да помогнат за изясняване на потенциалните съпътстващи фактори и механизми на резистентност, така че да могат да се разработят и тестват рационални комбинации в подкрепа на клиничното им внедряване.

Металните комплекси (по-специално тези на платината) имат широко приложение като терапевтични съединения в медицинската онкология. Съединенията на рутений са обект на внимание в много аспекти и са обещаващи кандидати при търсене на алтернативни антитуморни средства на метална основа. Те притежават редица предимства пред платиновите препарати, сред които ефикасност, съчетана с по-ниска токсичност, по-слабо изразена способност да предизвикват устойчивост в туморните клетки, липса на кръстосана резистентност с платиновите съединения. Рутеният се счита за добра

алтернатива на химиотерапевтиците на основата на платина. Много негови съединения са по-малко токсични от платиновите, а някои са доста селективни за туморните клетки поради способността му да имитира желязо при свързването с биомолекули. Поради повишената си нужда от желязо, туморните клетки свръхекспресират рецептори за трансферин, които могат ефективно да доставят комплекси на рутений до вътреклетъчната среда.

ЦЕЛ

Да се изследва влиянието на новосинтезирани комплекси на рутений [Ru(II)/(III)] с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия постоянни клетъчни линии и първични туморни култури и предизвиканите в тях цитопатологични промени.

ЗАДАЧИ

1. Да се определи влиянието на изследваните вещества върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетките (ЦК₅₀, ЦК₉₀) от използваните като експериментални модели клетъчни системи;
2. Да се проследи наличието на цитопатологични изменения в култивираните в присъствието на рутениеви съединения клетки;
3. Да се установи типът клетъчна смърт, предизвикана от веществата при третираните клетки (апоптоза / некроза);
4. Да се изследва способността на изследваните съединения да предизвикат автофагия;
5. Да се изолират първични клетъчни култури от тумори на пациенти с карцином на млечната жлеза, да се имунофенотипизират туморните клетки и да се проучи чувствителността им към антитуморни препарати и изследваните комплекси на рутений с шифови бази
6. Да се идентифицират клетъчни популации от туморни клетки със стволов фенотип в тъканни проби от инвазивен дуктален карцином на гърдата, както и при клетъчни линии (MCF7 и MDA-MB-231) чрез имухисто/имуцитохимично проследяване експресията на мембранните маркери (CD44 и CD24) и на цитоплазмено локализирания ензим ALDH1.
7. Да се проучи ефектът на изследваните вещества върху способността на туморните клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

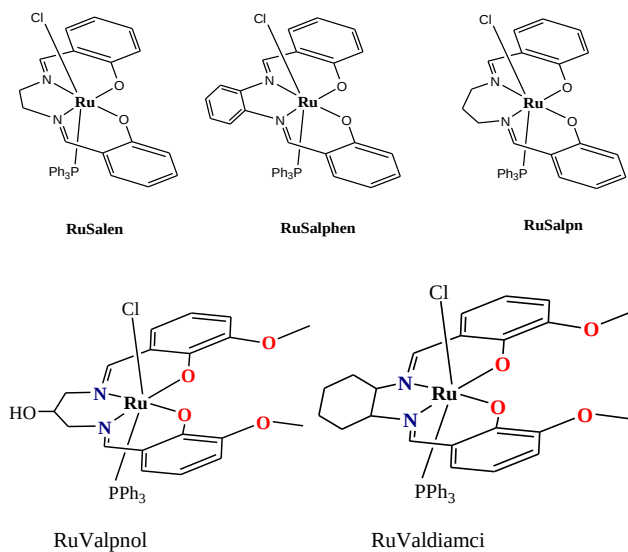
3.1 Материали

3.1.1 Изследвани комплекси на Ru(II)/(III) с Шифови бази

Бяха изследвани 8 новосинтезирани комплекса на Ru(III) с шифови бази и техният прекурсор Ru(II). (Таблица 1 и Фигура 1). Синтезът и физико-химичната характеристика на изследваните метални комплекси са извършени от д-р Даниела Кулица и д-р Габриела Маринеску, Институт по физикохимия “Илие Мъргулеску”, Букурещ, Румъния.

Таблица 1. Комплекси на Ru(II)/(III) с Шифови бази

№	Абревиатура	Комплекс	M _w g/mol
1	Прекурсор	[Ru ^{II} (PPh ₃) ₃ Cl ₂]	958.94
2	RuSalen	[Ru ^{III} (Salen)(PPh ₃)Cl]	664.86
3	RuSalphen	[Ru ^{III} (Salphen)(PPh ₃)Cl]	712.86
4	RuSalpn	[Ru ^{III} (Salpn)(PPh ₃)Cl].3H ₂ O	785.21
5	RuValen	[Ru ^{III} (Valen)(PPh ₃)Cl]	724.86
6	RuValphen	[Ru ^{III} (Valphen)(PPh ₃)Cl]	772.86
7	RuValpn	[Ru ^{III} (Valpn)(PPh ₃)Cl]	738.86
8	RuValpnol	[Ru ^{III} (Valpnol)(PPh ₃)Cl]	754.86
9	RuValdiamci	[Ru ^{III} (Valdiamci)(PPh ₃)Cl]	778.86



Фигура 1. Молекулни структури на комплексите на Ru(III)

3.1.2. Постоянни клетъчни линии

Като моделни системи в проведените *in vitro* експерименти бяха използвани 6 туморни (5 човешки и 1 плъх) и 2 нетуморни човешки постоянни клетъчни линии, представени в Таблица 2.

Таблица 2. Постоянни клетъчни линии, с които са проведени експериментите

Произход	Наименование	Вид	Произход	Онкоген или трансформиращ вирус
Човек	HT29	T	Колоректален карцином	mys+; ras+; myb+; fos+
	Saos-2	T	Остеосарком	
	HeLa	T	Карцином на шийката на матката	HPV – тип 18 (E5, E6, E7)
	MDA-MB-231 (=MBA)	T	Тройно негативен аденокарцином на млечната жлеза ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	-
	MCF-7	T	Метастатичен плеврален ексудат от аденокарцином на млечната жлеза Луминален тип A ER ⁺ , PR ⁺ , HER2 ⁻	WNT7B oncogene
	MCF10	HT	Нормален епител от млечна жлеза	-
	Lep-3	HT	Човешки ембрионален бял дроб	-
Плъх	LSR-SF(SR) (=RST)	T	Трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus щам Schmidt-Ruppin (SR-RSV)	v-src

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

LSR-SF-SR - трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus, щам Schmidt-Ruppin (клетките съдържат онкогена v-src). Клетъчна линия LSR-SF-SR е получена от д-р Ивайло Александров, двмн, и се поддържа в ИЕМПАМ-БАН от колектива на проф. Радостина Александрова, доктор. Използвана е аббревиатурата **RST** (Raus Sarcoma Tumor).

Сравнителни данни за някои от основните биологични характеристики на туморни (MCF-7, MDA-MB-231) и нетуморни (MCF10) клетъчни линии от млечна жлеза на човек

са представени в Таблица 3.

Таблица 3. Сравнителна характеристика на клетъчни линии с произход от млечна жлеза при човек

Клетъчна линия Характеристика	MDA-MB-231	MCF7	MCF10
Естрогенови рецептори	-	+	+
Прогестеронови рецептори	-	+	+
Рецептор за EGFR (HER2)	-	амплификация	нормален
Ген p53 – страж на генома	мутантен	див тип	див тип
Инвазивност	висока	ниска	-
Молекулярнобиологична класификация	Базалноподобен Тройнонегативен	луминален тип А	

Постоянните клетъчни линии, върху които са проведени експериментите, са получени от Банката за клетъчни култури и вируси на ИЕМПАМ-БАН. Клетките от нормален паренхим на гърда при човек (линия MCF10) ни бяха любезно предоставени от доц. Иван Илиев.

3.1.3. Първични клетъчни култури и хистологични материали

Първични клетъчни култури бяха изолирани от малигнени тумори, предоставени от Клиниката по гръдна хирургия към УСБАЛ по онкология - гр. София и Клиниката по костна патология на УСБАЛ по ортопедия - гр. София. Изследвани бяха и тъканни проби от инвазивни карциноми на млечната жлеза, фиксирани във формалини и включени в парафин. Хистологичните материали са от първичните огнища на инвазивни дуктални карциноми (метастатични и неметастатични първични инвазивни дуктални карциноми, туморни рецидиви), лимфни възли (метастатични и свободни от метастази) и далечни метастази (костни).

3.1.4. 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 (Gibco-Invitrogen, UK), обогатена с 10 % фетален телешки серум (FBS) (Gibco-Invitrogen, UK) и 1% разтвор на антибиотици със състав 10 000 U/ml пеницилин и 10 mg/ml стрептомицин (Lonza, USA).

При култивирането на клетъчна линия MCF-10A към хранителната среда бяха добавени допълнителни компоненти (Човешки епидермален растежен фактор, хидрокортизон, инсулин, холерен токсин).

3.1.5. Антитуморни лекарствени препарати

В експериментите за определяне на антитуморна активност бяха използвани следните широко прилагани в клиничната практика химиотерапевтици – цисплатина, оксалиплатина, епирубицин и паклитаксел, производство на Sigma-Aldrich, USA.

3.1.6. Реактиви за отчитане на клетъчната преживяемост

- MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) -Sigma-Aldrich (USA)
- трипаново синьо багрило AppliChem (Germany)
- неутрално червено (NR) - AppliChem (Germany)
- кристал виолет (CV) - AppliChem (Germany)

3.1.7. Реактиви за изготвяне на цитологични и хистологични микроскопски препарати

Светлинномикроскопски изследвания:

- Хематоксилин Gill III (Bio Gnost, Croatia)
- Еозин (LeicaBiosystems, UK)
- 10% неутрален буфериран формалин (JTBaker, Netherlands).
- Абсолютният алкохол (Ethanol 100%), метанолът, ксилолът и средата за включване на микроскопски препарати (Bio-Mount DPX) са закупени от BioGnost (Croatia).

Флуоресцентна микроскопия:

- Включваща среда за флуоресцентни препарати Fluoroshield Mounting Medium (ab104135, abcam, UK)
- Акридин оранж (AO) AppliChem (Germany)
- Пропидиев йодид (PI) AppliChem (Germany)
- Набор за изследване на автофагия CYTO-IDR Autophagy Detection KIT (Enzo Life Sciences, USA, ENZ-5103)
- Набор за имунофлуоресцентно доказване на анексин (AnnexinV Apoptosis Detection Kit), продукт на ImmunoCRUZ (USA)

3.1.8. Моноклонални и поликлонални антитела за имуноцитохимично/имунохистохимично определяне експресията на

маркери, характеризиращи пролиферативната активност, типа на клетъчната смърт, клетъчната диференциация и активността на хормоналните рецептори

- Поликлонално заешко антитяло, специфично срещу човешки, миши и плъши ядрен протеин Ki67 (Quartett, Germany, KI003)
- Моноклонални миши антитела, специфични срещу човешки Ki67, Estrogen Receptor, Progesteron Receptor, c-erbB-2 Oncoprotein, Vimentin и поликлонално заешко антитяло, специфично Поликлонално антитяло, специфично срещу Cytokeratin AE1/AE3 (Leica Biosystems, UK)
- Поликлонални заешки антитела, специфични срещу протеин, маркиращ ранна апоптоза AnnexinV и срещу автофагозомалния протеин LC3B (abcam, UK)
- Моноклонални миши антитела, специфични срещу CD24 и CD44, поликлонално заешко антитяло, специфично срещу ALDH1 (Quartett, Germany)
- Стандартна негативна контрола – Negativ control (LeicaBiosystems, UK, PA0777).
- Разтвор за титриране на антитела IHC Diluent (LeicaBiosystems, UK, RE7133)

Визуализацията на изследваните маркери беше осъществена чрез хромогенния визуализиращ кит Novolink Polymer Detection Systems (LeicaBiosystems,UK,RE7280-CE)

3.1.9. Стерилна пластмасова посуда

96-, 48-, 24-,12- и 6–ямкови плаки, петрита, матраци, серологични пипети и филтри (0.2µm) за стерилизиране на среди и разтвори са закупени от OrangeScientific (Belgium)

Всички останали използвани вещества с висока степен на чистота са осигурени от местни доставчици.

3.2 МЕТОДИ

3.2.1. Култивиране и съхранение на постоянни клетъчни линии

Клетките от постоянни клетъчни линии бяха замразявани, съхранявани и култивирани съгласно препоръките на ATCC. Всички процедури бяха извършени при стерилни условия в ламинарен бокс клас II.

3.2.2. Изолиране на първични клетъчни култури

Получаването на първични култури беше извършено чрез модифициране и оптимизиране на познати протоколи (Freshney, 1992). Приложени бяха два метода за изолиране на клетъчни култури – чрез миграция на клетки от тъканен експлант и чрез механично раздробяване с последваща ензимна обработка до получаване на суспензия от единични клетки.

3.2.3. Определяне на клетъчна жизнеспособност – Преброяването на клетките и определянето на тяхната жизнестойност беше извършено след оцветяване с трипаново синьо с помощта на електронен клетъчен брояч (Invitrogen™ Automated Cell Counter), в съответствие с инструкциите на производителя.

3.2.4. Методи за определяне на цитотоксична активност

Определянето на влиянието на изследваните съединения върху преживяемостта на клетките беше извършено чрез използване на МТТ тест, тест за цитотоксичност с поглъщане на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV). Преживяемостта на клетките, третирани с изпитваните вещества се оценява в % в сравнение с контролата (при която процентът на живите клетки се приема за 100 %). Получените стойности бяха използвани за построяване на графики "Концентрация-отговор" (за всяка клетъчна линия, интервал на третиране и изследвано вещество), от която бяха определени ЦК₅₀ (концентрация на веществото, причиняваща смъртта на 50 % от клетките в сравнение с контролата) и ЦК₉₀ (причиняваща съответно смърт при 90 % от клетките).

3.2.5. Тест за определяне на пролиферативната активност на третирани клетки чрез имуноцитохимично изследване експресията на Ki67 с моноклонално мише антитяло, специфично срещу човешки Ki67) и поликлонално заешко антитяло, специфично срещу човешки, миши и плъши ядрен протеин Ki67. За визуализиране на реакцията антиген-антитяло беше приложена имуноцитопероксидазна реакция с полимерно маркиране и DAB хромоген (Novolink Polymer detection Systems RE7140-K, LeicaBiosystems, Великобритания).

3.2.6. Методи за оценка на клетъчната морфология

- Инвертна микроскопия на суправитални клетки
- Оцветяване с хематоксилин-еозин при фиксирани препарати
- Двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI)

3.2.7. Методи за оценка на предизвикателен тип клетъчна смърт – апоптоза/некроза

- Имуноцитохимично доказване на апоптоза чрез определяне локализацията на Annexin V

- Имунофлуоресцентно изследване с FITC-конюгиран Annexin V
- Двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/PI)

3.2.8. Методи за изследване на потенциалната възможност на проучваните съединения да предизвикват автофагия

- Трансмисионна електронна микроскопия
- Имуноцитохимично изследване за автофагия чрез определяне нивата на експресия на протеин LC3B

- Конфокална флуоресцентна микроскопия при реакция с Монодансил-кадаверин (MDC)

3.2.9. Детекция на клетъчни популации с фенотип на туморни стволови клетки чрез имунохистохимично изследване на експресията на маркери, характеризиращи стволов фенотип (CD24, CD44 и ALDH1)

3.2.10. Метод за изследване на миграционната способност на туморни клетки, третирани с изследваните химични комплекси, основан на заздравяването на рани (wound healing) след скарификация на клетъчния монослой

3.2.11. Метод за изследване на 3D-колонии-формираща способност – образуване на триизмерни колонии в полутечен агар.

3.2.12. Рутинни методи за микробиологично изследване

3.2.13. Статистическа обработка на експерименталните данни и снимков материал

Интерпретацията на експерименталните резултати беше направена след обработка по метода на вариационния анализ, на базата на изчисляване на двата основни статистически параметъра: средната аритметична величина ($\bar{x}$) и нейната грешка (SEM), последван от еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA). Сравнението между отделните групи от резултати беше извършено чрез *Dunnet* тест, като за дорстоверна беше отчетена разликата между групите при приетото за биологични експерименти ниво на значимост $P < 0.05$. За статистическата обработка на експерименталните данни беше използвана компютърната програма Graph Pad Prism 6.0, Graph Pad Software Inc. и Origin 6.1TM, САЩ.

Микрофотографиите бяха направени с помощта на микроскоп Leica DM5000, камера Leica DFC 420, регистриращ софтуер за изображения Leica Suite 3.1.0 (Leica Microsystems, Germany).

4. Резултати

4.1. Експерименти с постоянни клетъчни линии

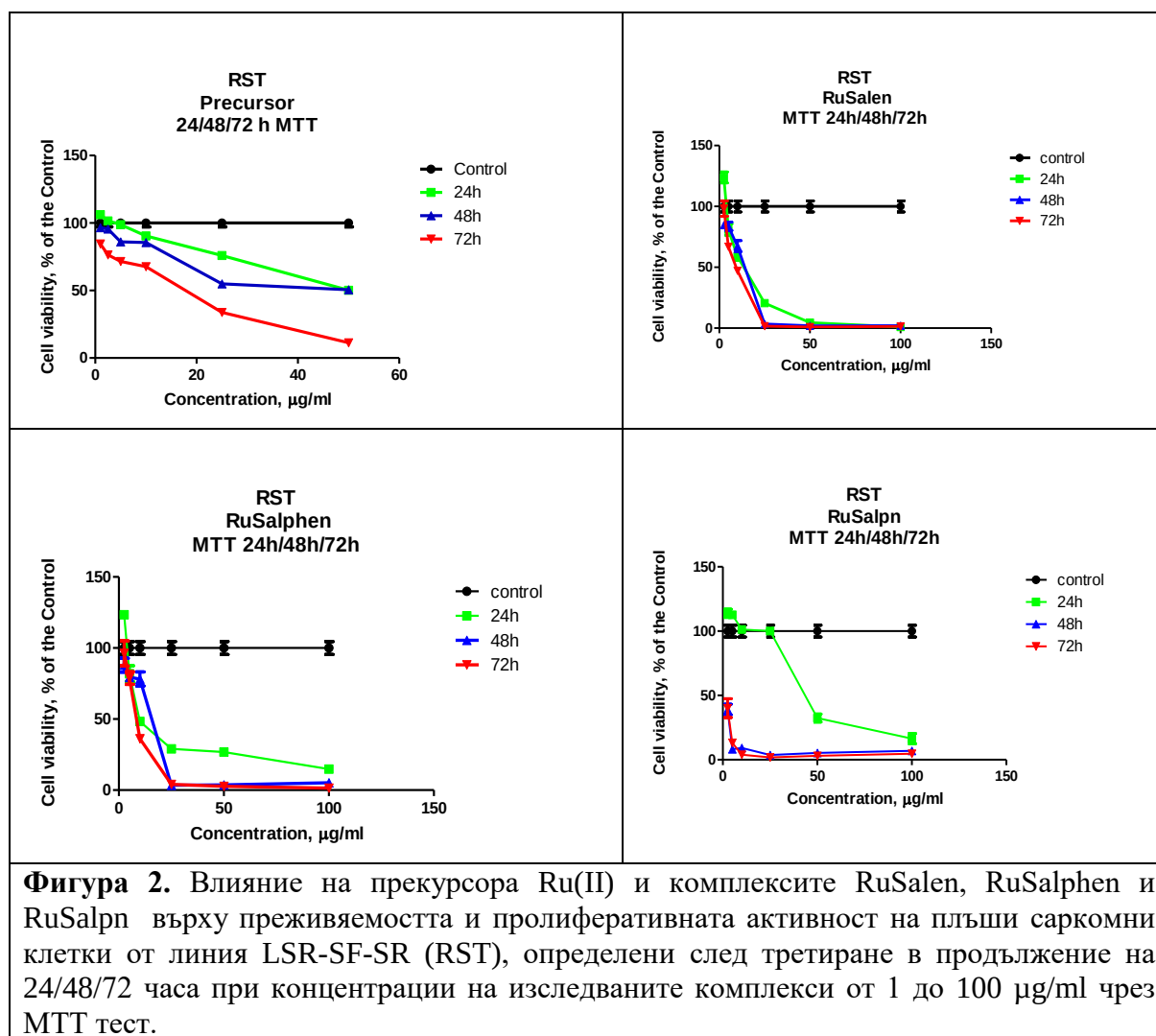
Изследван беше ефектът върху клетъчната преживяемост при човешки туморни клетъчни линии, получени от тройно негативен карцином на млечната жлеза (MDA-MB-231), естроген-положителен метастазирал аденокарцином на гърдата (MCF7), аденокарцином на дебелото черво (HT29), остеогенен сарком (Saos-2), цервикален аденокарцином (HeLa) и RST (LSR-SF-SR - трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с Rous sarcoma virus, щам Schmidt-Ruppin). За съпоставка на цитотоксичността върху извънтуморните тъкани бяха използвани постоянни клетъчни линии MCF10, получена от нормален човешки мамарен паренхим и Lер3, получена от човешки ембрионални фибробласти.

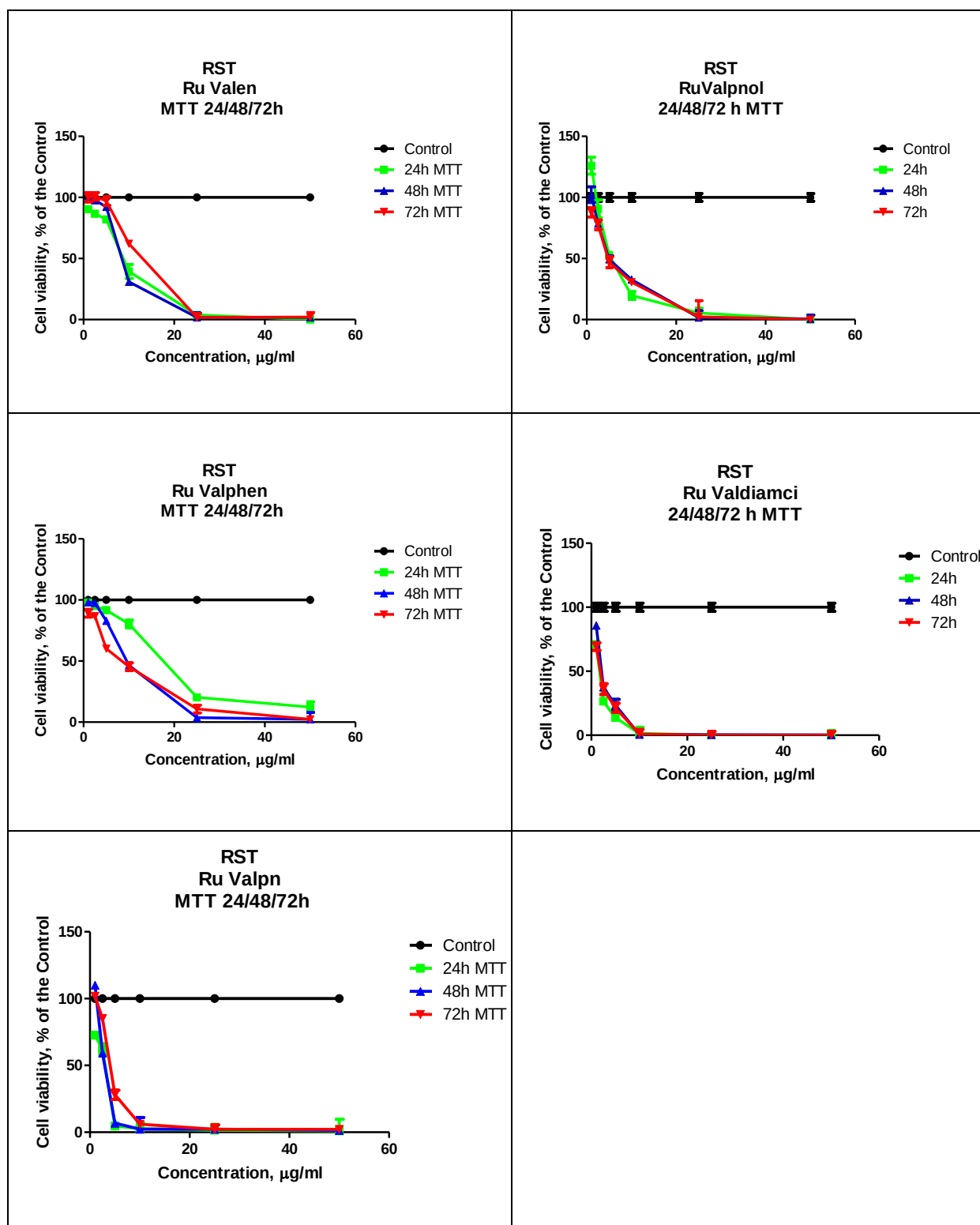
Изследваните рутениеви комплекси (Таблица 1) бяха приложени в концентрации 1 – 100 µg/ml (1–400 µg/ml при клетъчна линия Saos-2) в продължение на 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа. Цитотоксичният им ефект е определен чрез МТТ тест, метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV). С получените данни бяха построени криви „концентрация-отговор“ и бяха определени концентрациите на веществата, които намаляват клетъчната преживяемост / пролиферативна активност с 50% (ЦК₅₀) и с 90% (ЦК₉₀) в сравнение с контролата. Част от получените резултати са представени на Фигури 2 - 7 и Таблицы 4 - 5.

Всички изследвани вещества намаляват в различна степен преживяемостта и пролиферативната активност на третираните клетки.

Със сравнително най-висока цитотоксичност се отличава комплексите Ru Salpn и RuValdiamci.

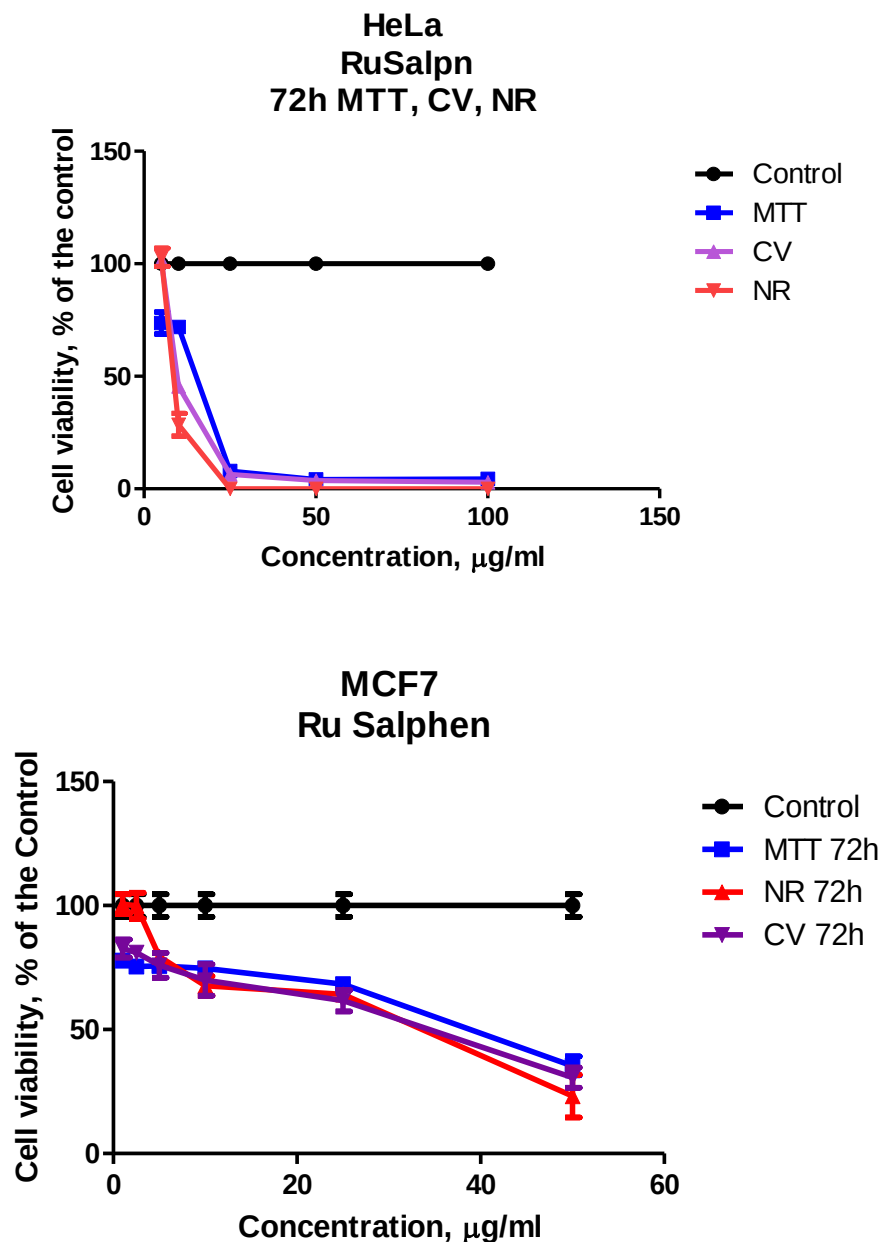
Почти няма разлика в клетъчната преживяемост при третиране в продължение на 24, 48 и 72 часа.





Фигура 3. Влияние на комплексите RuValen, RuValphen, RuValpn, RuValpnol и RuValdiamci върху преживяемостта и пролиферативната активност на пльши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR (RST). Веществата са приложени в концентрации 1-100 µg/ml за 24/48/72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

Приложените 3 метода с различни клетъчни мишени – MTT, NR и CV показват близки резултати (Фигура 4).

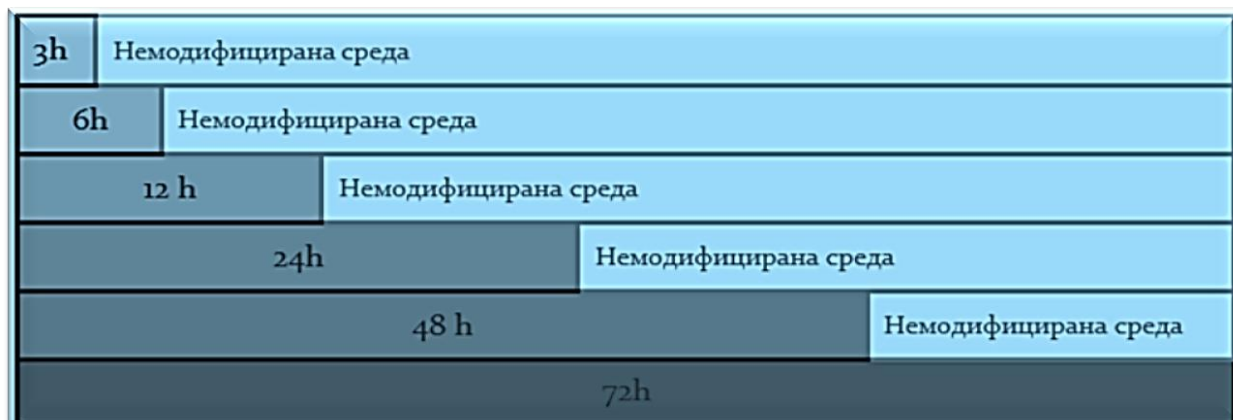


Фигура 4. Влияние на комплексите RuSalpn и RuSalphen върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от цервикален карцином при човек (линия HeLa) и линия MCF7 (карцином на гърдата при човек). Веществата са приложени в концентрации 1-50 µg/ml за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест и оцветяване с неутрално червено (NR) и кристалвиолет (CV).

За да отговорим на въпросите

1. Кога най-рано се проявява цитотоксичният ефект?
2. Обратим ли е ефектът?

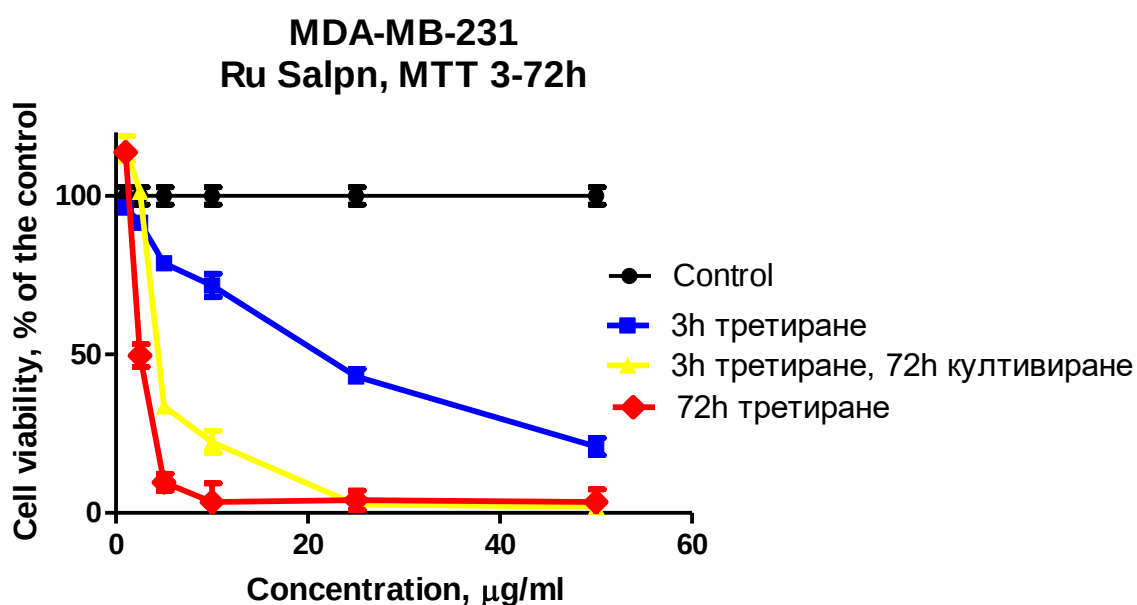
проведохме експеримент с краткосрочно третиране в продължение 3, 6, 12, 24 и 48 часа в модифицирана с изследваните вещества среда, последвано от МТТ тест. Успоредно с

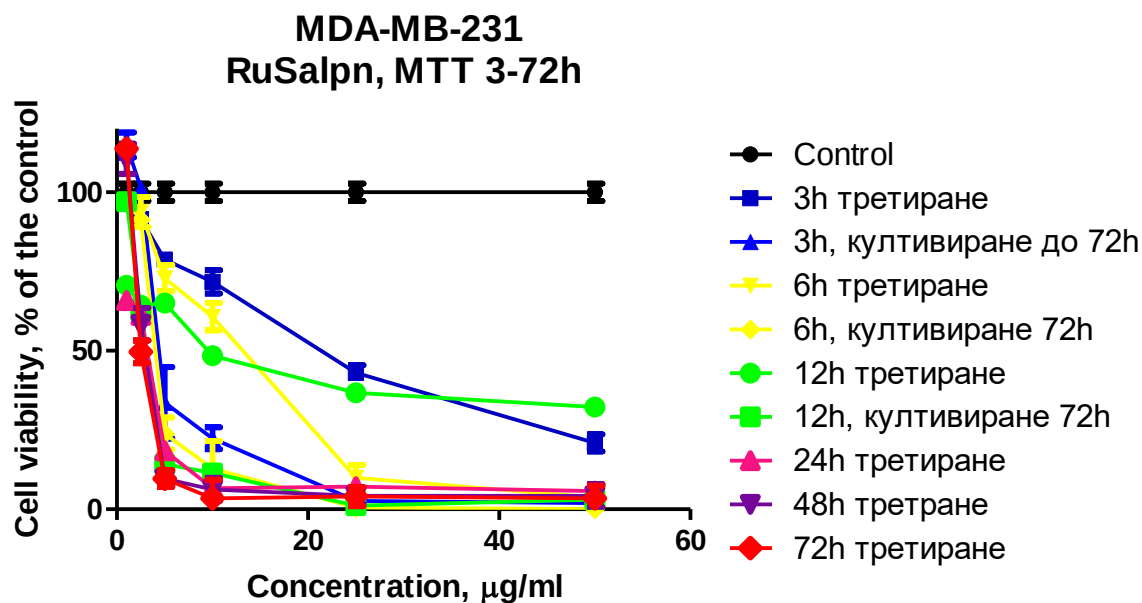


това клетки бяха третирани за същите интервали (3, 6, 12, 24, 48 часа), след което средата беше подменена с немодифицирана, култивирането продължи общо 72 часа, след което беше проведен МТТ тест.

Фигура 5. Графично представяне на експериментален модел за проследяване обратимостта на цитотоксичния ефект на изследваните комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази.

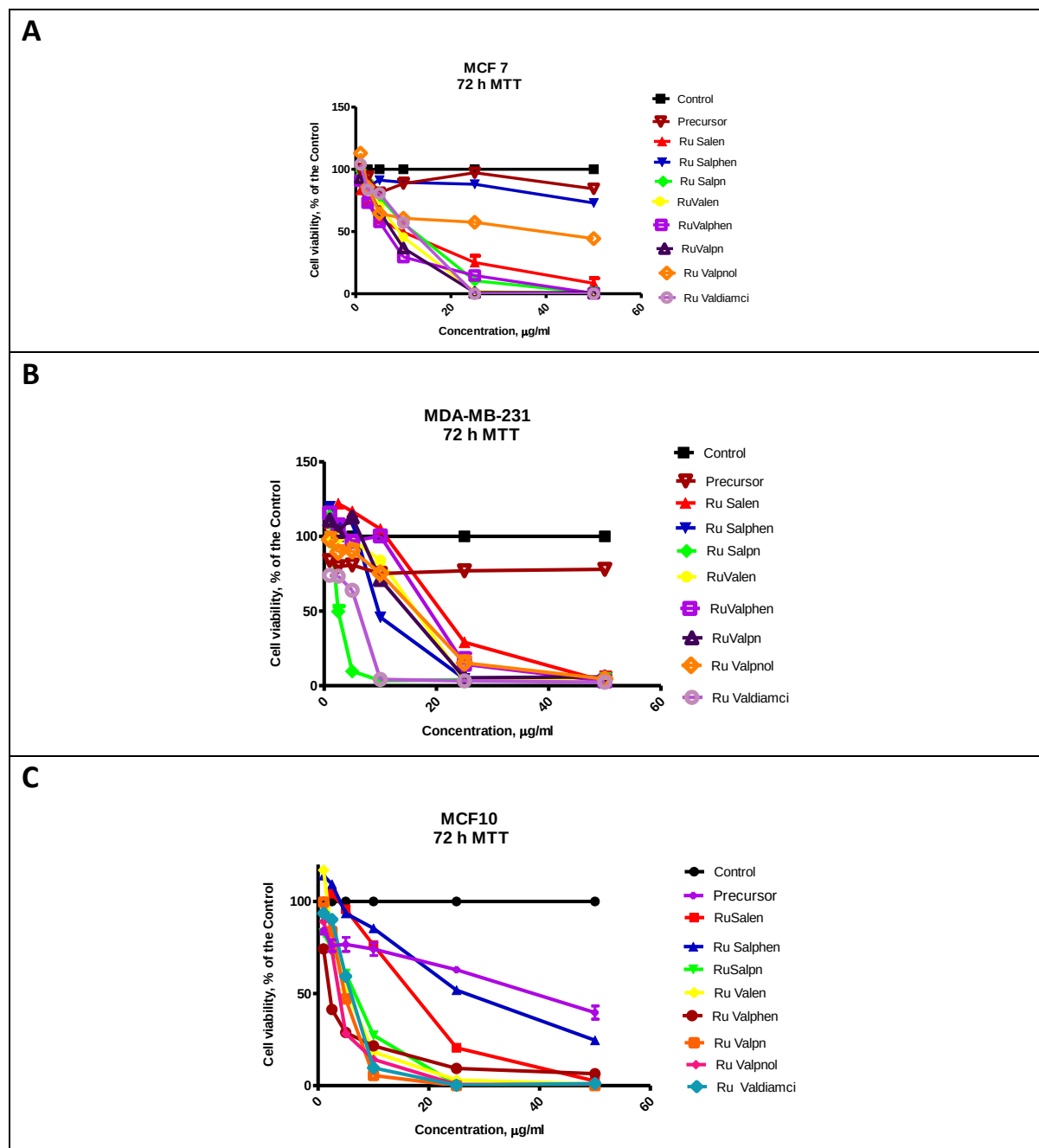
Проведеният МТТ тест показва, че преживяемостта на третираните клетки намалява още на 3 и 6 час. Цитотоксичният ефект се задълбочава след отстраняване на активното вещество от средата и продължаващо култивиране в немодифицирана среда до 72 час. Преживяемостта на клетките е най-ниска когато са култивирани за 72 часа в присъствие на изпитваното вещество.





Фигура 6. Влияние на комплексите на Ru (III) с шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от тройнонегативен карцином на гърдата у човек (клетъчна линия MDA-MB-231). Веществата са приложени в концентрации 1-50 $\mu\text{g/ml}$ за 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа, след което култивационната среда е заменена с немодифицирана с вещества хранителна среда. Клетъчната преживяемост е изследвана на 72-ия час чрез MTT тест. За сравнение са показани данни за преживяемостта след третиране в продължение на 3 и 6 часа, като резултатите са отчетени съответно на 3 и 6 час с MTT тест

Клетъчно-специфичен цитотоксичен ефект на изследваните рутениеви комплекси с Шифови бази върху преживяемостта на клетки от карцином на гърдата у човек (клетъчни линии MCF7 и MDA-MB-231) и човешки нетуморни клетки от паренхим на млечна жлеза (клетъчна линия MCF10)



Фигура 7. Влияние на комплекси на Ru(II)/(III) с Шифови бази върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от карцином на гърдата у човек - линия MCF7 (A), MDA-MB-231 (B), и човешки нетуморни клетки от паренхим на млечна жлеза от клетъчна линия MCF10 (C). Веществата са приложени в концентрации 1-50 µg/ml за 72 часа. Изследването е проведено чрез MTT тест.

За да сравним цитотоксичния ефект на изследваните от нас новосинтезирани комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази изследвахме влиянието на утвърдени антитуморни препарати върху преживяемостта и пролиферативната активност на използваните като експериментални модели постоянни клетъчни линии. С получените данни бяха построени криви “концентрация-отговор” и бяха определени концентрациите на веществата, които намаляват клетъчната преживяемост/пролиферативна активност с 50% (ЦК₅₀) и с 90% (ЦК₉₀). Получените стойности бяха използвани при съставянето на йерархични редове за отделните клетъчни линии, в които новосинтезираните комплекси на Ru(II)/(III) и изследваните от нас утвърдени химиотерапевтици са подредени в низходяща последователност според способността им да намаляват преживяемостта на третираните клетки въз основа на цитотоксични концентрации ЦК₅₀ (μM) и ЦК₉₀ (μM), определени чрез МТТ тест (МТТ); метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV), след въздействие в продължение на 24, 48 и 72 часа (Таблица 4).

Таблица 4. Йерархични редове на комплекси на Ru(II)/(III) и утвърдени антитуморни препарати, отразяващи способността им да намаляват преживяемостта на третираните клетки

Клетъчна линия	Йерархичен ред съобразно ЦК ₅₀ МТТ 72 час
Lep3	CisPt > Epirub > OxPt >RuValpn>RuValpnol>RuValphen>RuValdiamci>RuSalpn>RuValen>RuSalphen>RuSalen>Precursor
RST	RuValdiamci> CisPt >RuValpn>RuValpnol>RuSalpn>RuValphen>>RuSalphen>RuSalen>RuValen>Precursor
HT29	Paclitaxel >RuSalpn>RuValdiamci>RuValpnol> Epirubicin >>RuSalen>RuValpn>RuSalphen>RuValen>RuValphen>Precursor> CisPt, OxPt
Saos-2	Epirub >RuValdiamci>RuValpn>RuValpnol>RuValen>>RuValphen> CisPt >RuSalpn>RuSalphen>Precursor>RuSalen> OxPt
HeLa	RuValpnol>RuValdiamci>RuValpn>RuValphen> OxPt >RuValen>>RuSalpn> CisPt >RuSalen>RuSalphen> Epirub >Precursor
MCF7	

	RuValphen>RuValpn>RuValen>RuValdiamci>RuSalpn>RuSalen> > Epirubicin >RuValpnol>RuSalphen> CisPt > OxPt >Precursor
MDA	RuSalpn>RuValdiamci>RuValpn>RuSalphen> Epirubicin > >RuValphen>RuValen>RuValpnol> OxPt >RuSalen> CisPt >Precursor
MCF10	RuValphen> OxPt >RuValpnol>RuValpn>RuValen>RuValdiamci> >RuSalpn> CisPt >RuSalen>RuSalphen>Precursor> Epirubicin

Изследваните вещества са подредени в низходяща последователност според способността им да намаляват преживяемостта на третираните клетки въз основа на цитотоксична концентрация ЦК₅₀ (μM), определена чрез MTT тест след въздействие в продължение на 72 часа.

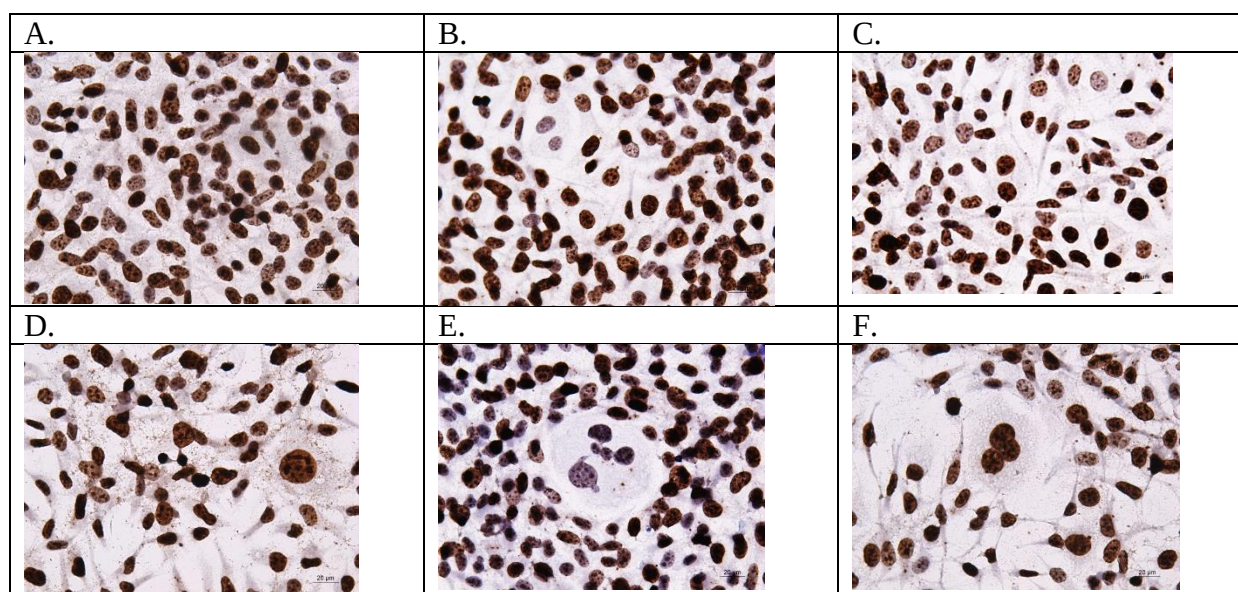
В Таблица 5 са представени стойностите на ЦК₅₀ и ЦК₉₀ (µg/ml и µM) на един от показалите най-висока цитотоксична активност комплекси на Ru(III) - RuSalpn.

Таблица 5. Цитотоксична концентрация 50 (ЦК₅₀, µg/ml и µM) и цитотоксична концентрация 90 (ЦК₉₀, µg/ml и µM) на комплекса RuSalpn при изследваните постоянни клетъчни линии. Резултати са получени чрез МТТ тест след 72 часа третиране.

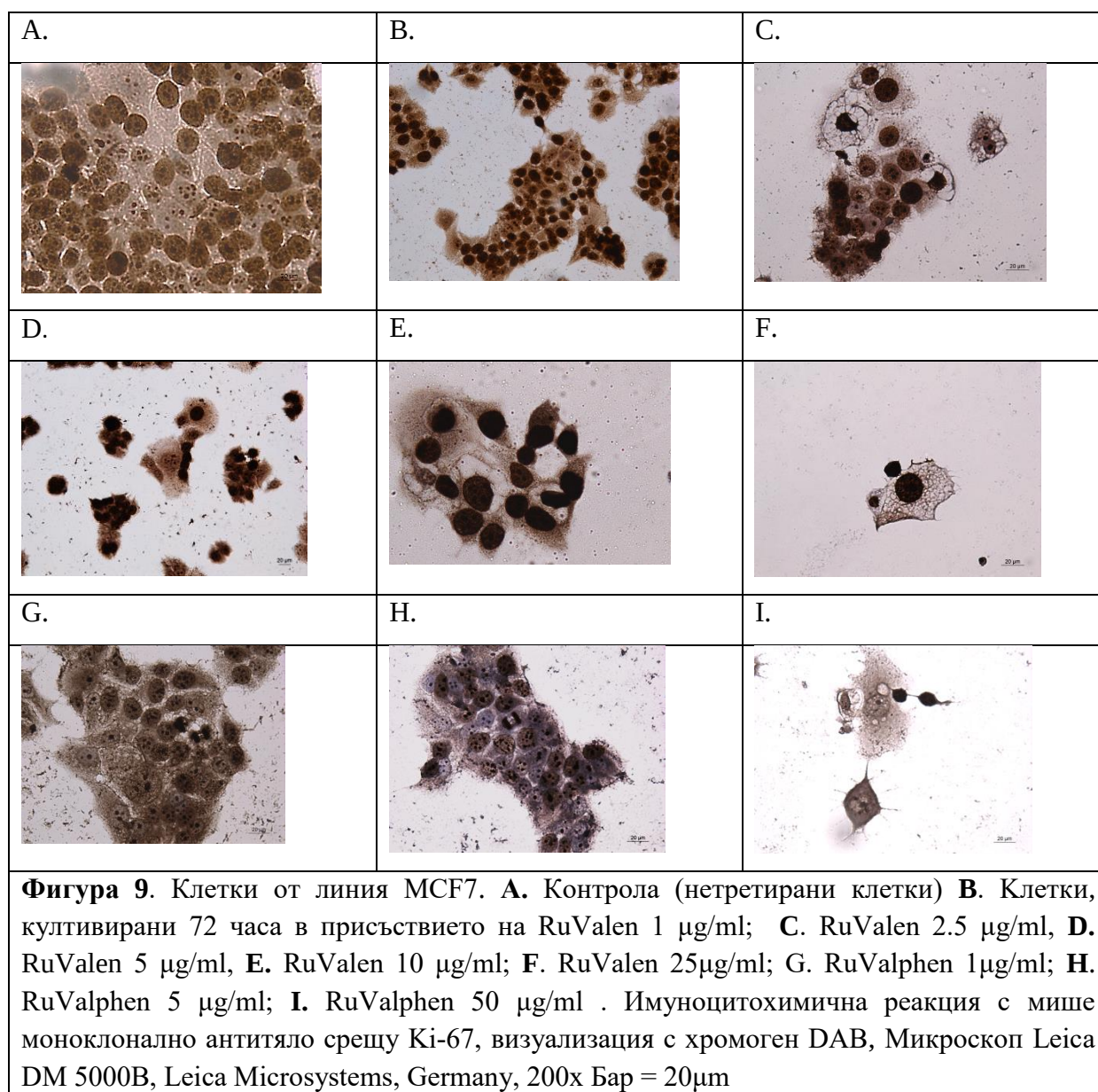
Ru Salpn	ЦК ₅₀		ЦК ₉₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Lep3	6.4	9.5	13.1	19.2
RST	5,2	7,7	9,7	14,2
HT29	2.5	3.7	8.3	12.3
Saos-2	41.1	60.5	91.3	134.5
HeLa	14.8	21.7	24.3	35.8
MCF7	12.3	18.1	23.9	35.1
MDA-MB-231	2.9	4.3	6.1	8.9
MCF10	6.6	9.8	19.9	29.4

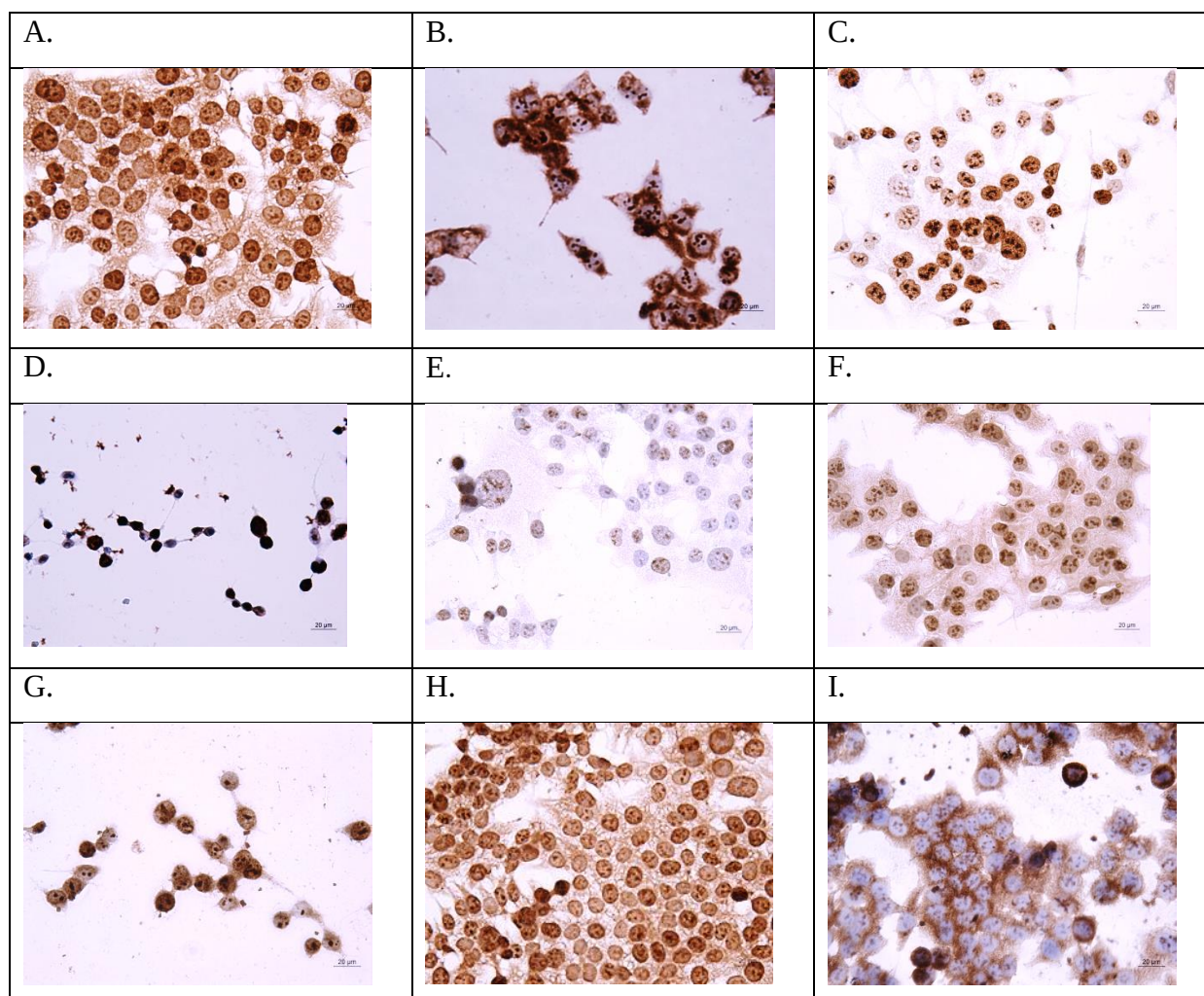
Влияние на изпитваните комплекси на рутений (II)/(III) с шифови бази върху експресията на маркера за пролиферативна активност Ki67

Ki67 е белтък, който се експресира от G1 до M фаза на клетъчния цикъл. С негова помощ може да се оцени пултът от пролифериращи клетки, върху който въздействат химиотерапевтичните препарати. Положителната имуноцитохимична реакция за Ki67 показва, че клетката се намира в интервала от късна G1-фаза до M-фаза включително. По време на интерфазата Ki67 влиза в състава на хетерохроматина в областта на ядрцата. Започвайки от късна G1-фаза, участва във формирането на малки гранули в ядрото, а през G2 и S-фазите образува големи фокуси хетерохроматин с ядрцата. През M-фазата локализацията на Ki67 коренно се променя и той преминава на повърхността на кондензираните хромозоми. При изследваните туморни клетъчни линии (MDA-MB-231, MCF-7, Saos-2, HeLa) имуноцитохимичната реакция показва запазена експресия на Ki67 след третиране с комплекси на Ru(III) с шифови бази (Фигури 8 и 9). Негативна реакция беше установена при по-малко от 5% от третираните туморни клетки. Изместена в нехарактерна локализация (цитоплазма) експресия на Ki67 беше наблюдавана при клетки от линия HeLa след третиране с комплексите RuSalen и RuSalpn (Фигура 10).



Фигура 8. Клетки от линия MDA-MB-231. **A.** Контрола (нетретираны клетки) **B.** Клетки, култивирани 24 часа в присъствието на RuValen 2.5 µg/ml; **C.** RuValen 5 µg/ml, **D.** RuValen 10 µg/ml, **E.** RuValphen 5 µg/ml; **F.** RuValpn 1 µg/ml. Имуноцитохимична реакция с мише моноклонално анти тяло срещу Ki-67, визуализация с хромоген DAB, Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Germany, 200x Бар = 20µm



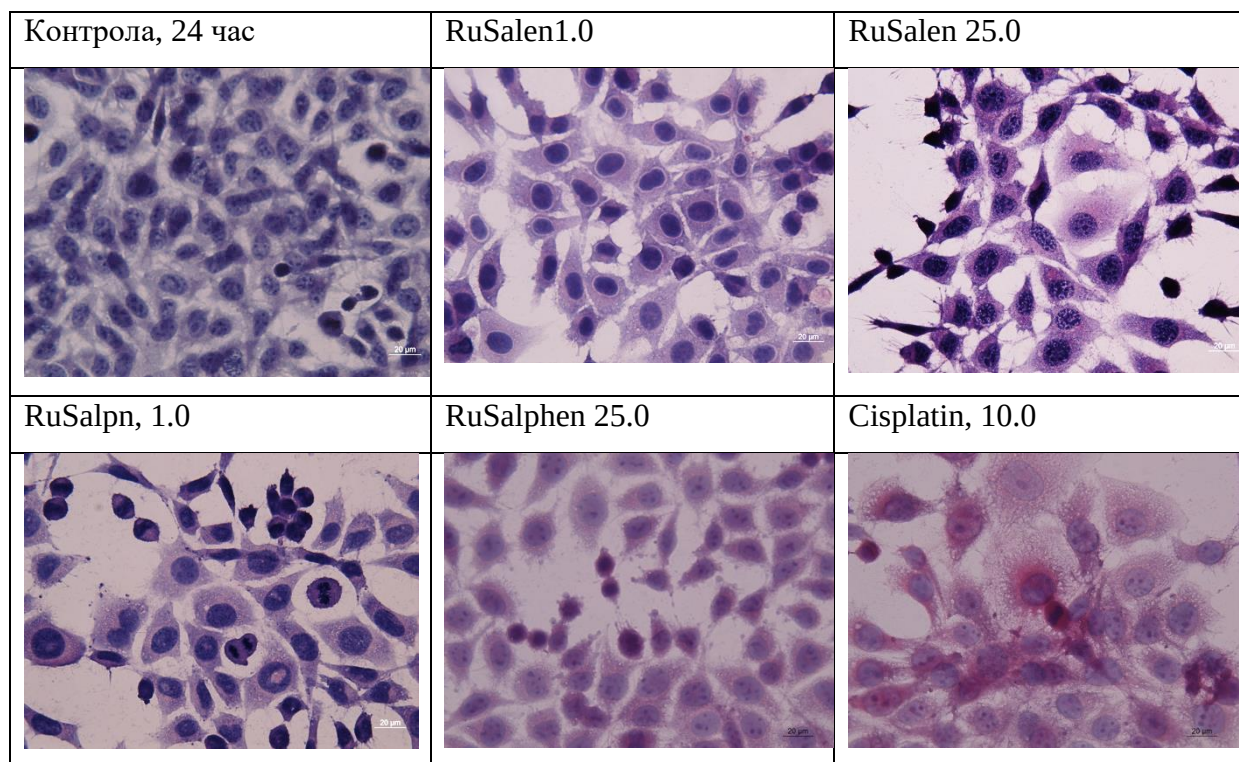


Фигура 10. Клетки от линия HeLa. **A.** Контрола (нетретираны клетки) **B.** Клетки, култивирани 72 часа в присъствието на RuSalen 5 µg/ml; **C.** RuSalen 10 µg/ml, **D.** RuSalen 25 µg/ml, **E.** RuSalphen 5 µg/ml; **F.** RuSalphen 25µg/ml; **G.** RuSalphen 50µg/ml; **H.** RuSalpn 0.5 µg/ml; **I.** RuSalpn 1 µg/ml . Имуноцитохимична реакция с мише моноклонно анти тяло срещу Ki-67, визуализация с хромоген DAB, Микроскоп Leica DM 5000B, Leica Microsystems, Germany, 200x Бар = 20µm

Цитопатологични изменения, предизвикани от изпитваните комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази

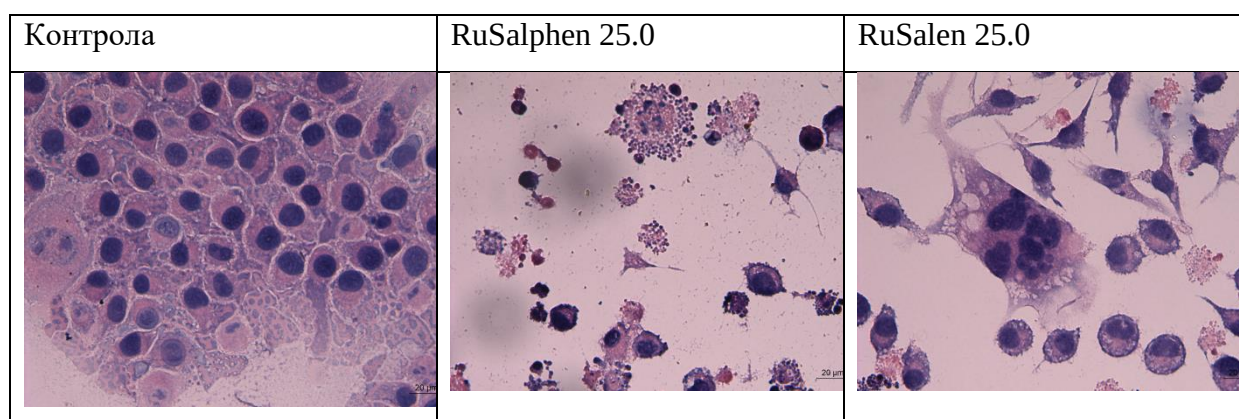
При клетките, третирани с изследваните комплекси, бяха наблюдавани разнородни по вид и степен цитопатологични изменения, основно засягащи адхезионната им способност и плътността на образувания монослой. Клетките придобиваха окръглена форма, цитоплазмата беше силно вакуолизирана. За уточняване на предизвиканите цитоморфологични промени бяха изготвени препарати от култивирани върху стъклени ламели контролни и третирани с изследваните вещества клетки. Чрез оцветяване с хематоксилин и еозин бяха добре визуализирани промените в клетъчната морфология.

(Фигура 11А и 11Б). Отчетени бяха наличието или отсъствието на митози, изместване на ядрено-цитоплазмения индекс, интензивно формиране на цитоплазменени морфологични структури, ацидофилен /базофилен цитозол, разрушаването на адхезионните връзки между съседни клетки.



Фигура 11А.

Цитопатологични промени при клетки от линия MDA-MB-231, 24 час
Оцветяване с Н&Е, Микроскоп Leica DM5000B, 200х



Фигура 11Б. Цитопатологични промени при клетки от линия LSR-SF-SR

Оцветяване с Н&Е, Микроскоп Leica DM5000B, 200х

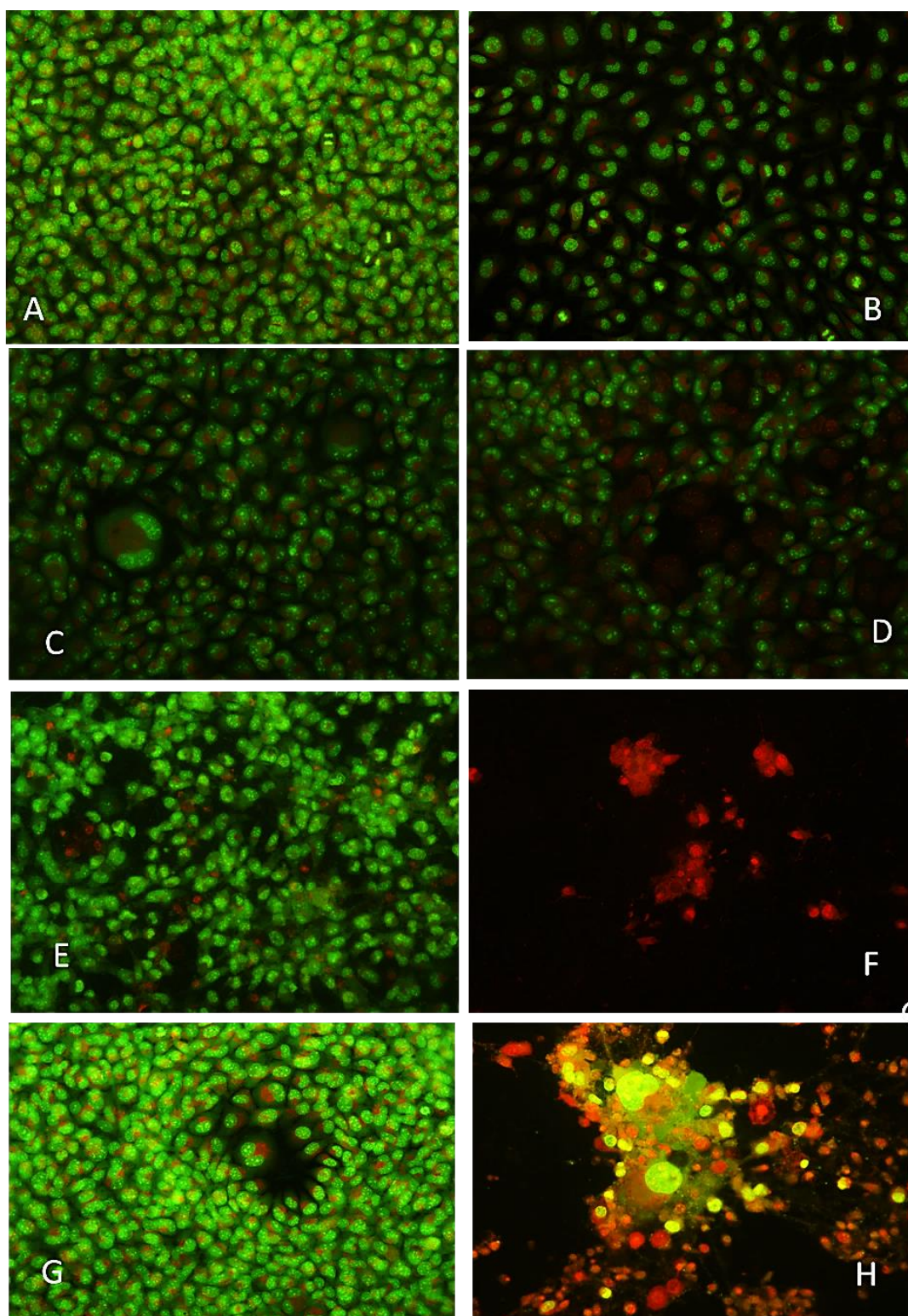
Оценка на предизвикания тип клетъчна смърт

Двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид

Чрез това комбинираното оцветяване установихме виталността на клетките, като същевременно добре се визуализираха промените в клетъчната морфология и белезите на апоптоза.

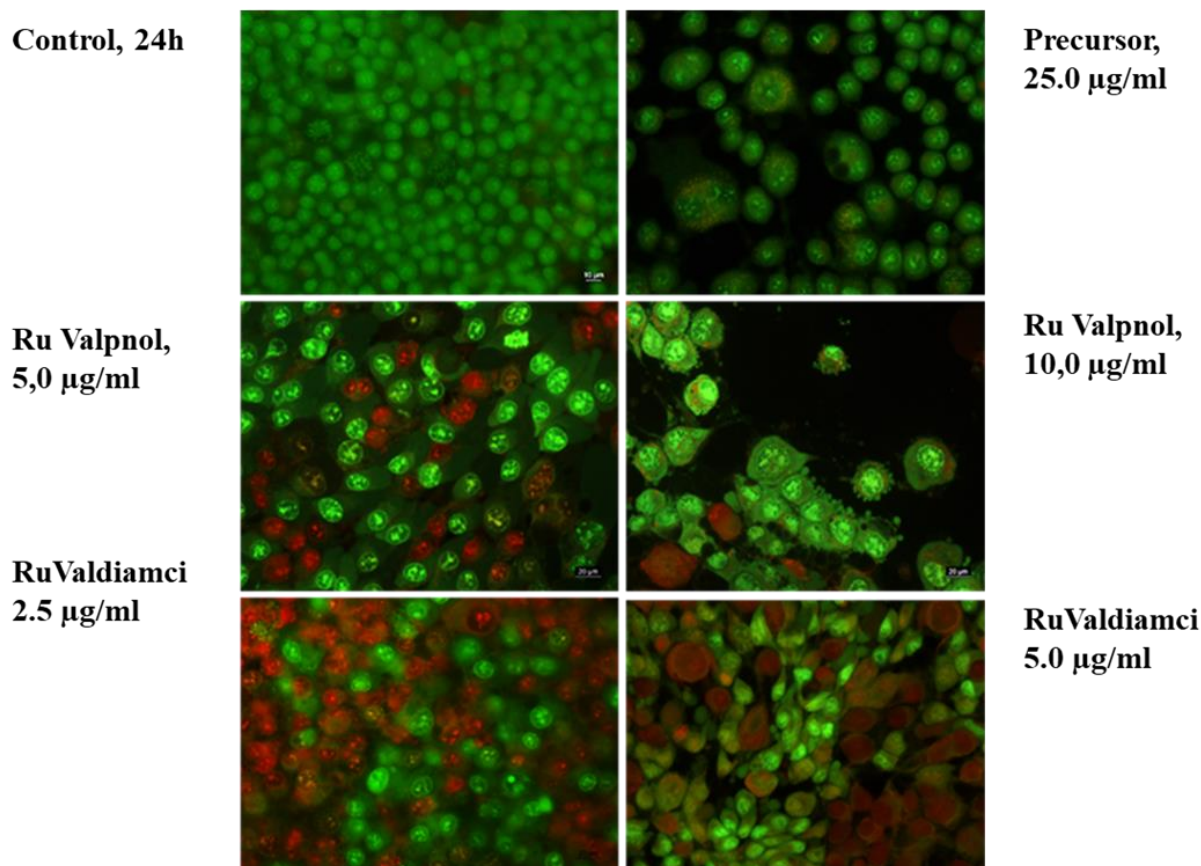
Белезите на клетъчна смърт бяха оценени по следния начин: начален стадий на апоптоза - ярко зелено ядро с кондензация на хроматин под формата на плътни зелени области и формиране на характерни апоптотични изпъквания по клетъчната повърхност („apoptotic blebs,,); напреднал стадий на апоптоза - оранжево-червено ядро с кондензация на хроматина; късен стадий на клетъчна смърт - тъмночервено оцветени клетки. Апоптотични изменения в третираните с изпитваните вещества клетки, наблюдавани след двойно оцветяване с пропидиев йодид и акридин-оранж са представени на Фигури 12-14.

Флуоресцентно-микроскопските изследвания бяха извършени и фотодокументирани с любезното съдействие на доц. д-р Веселин Нанев и доц. Ивелин Владов, ИЕМПАМ-БАН.



Фигура 12. Цитопатологични изменения при клетки от линия MDA-MB-231 (тройнонегативен карцином на гърдата у човек), третирани с комплекси на рутений с Шифови бази (Salen, Salphen и Salpn). (A). Контрола – нетретирани клетки MDA-MB-231; (B) Клетки MDA-MB-231 след 72 часа третиране с RuSalen 10 $\mu\text{g/ml}$; (C,D) RuSalen 25 $\mu\text{g/ml}$; (E) RuSalphen 5 $\mu\text{g/ml}$; (F) RuSalphen 10 $\mu\text{g/ml}$; (G) RuSalpn 5 $\mu\text{g/ml}$; (H) RuSalpn 10 $\mu\text{g/ml}$

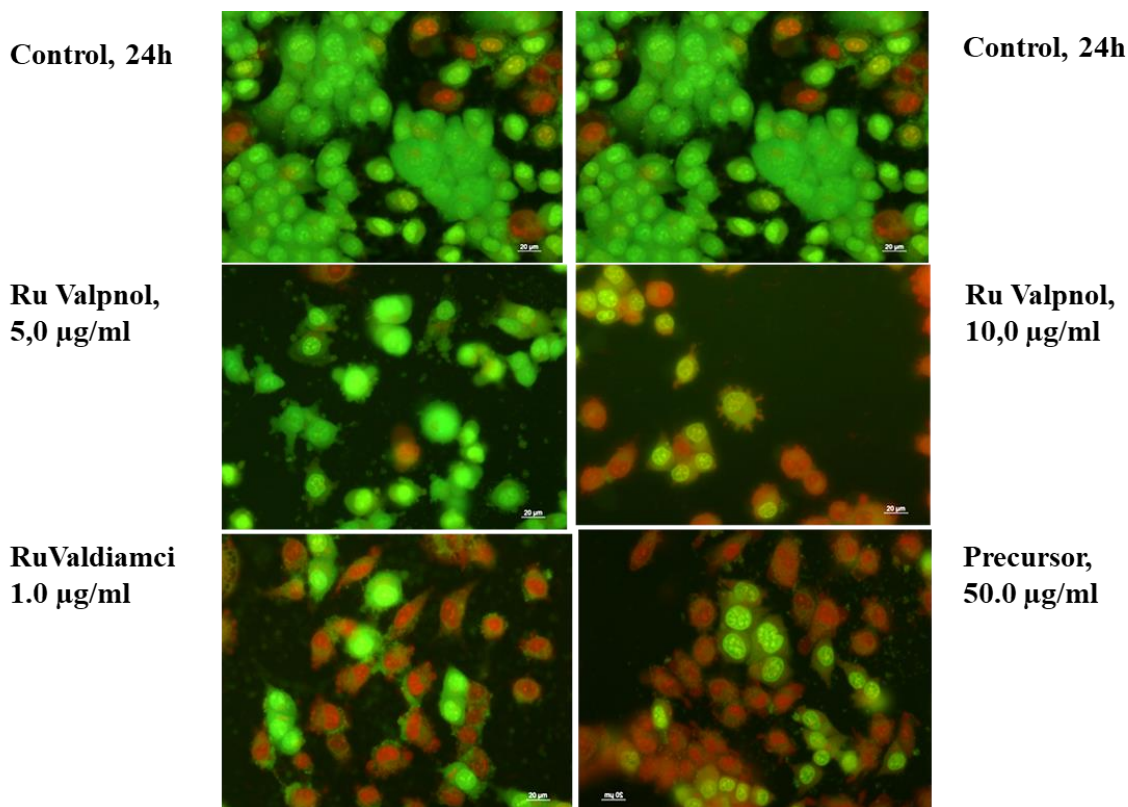
При клетки от трансплантируем плъши сарком (клетъчна линия LSR-SF-SR) след 24-часово третиране с изследваните комплекси на рутений бяха регистрирани различни по степен и вид промени, засягащи клетъчната морфология (Фигура 10).



Фигура 13. Клетки от линия LSR-SF-SR, третирани с комплексите RuValpnol и RuValdiamci и техния прекурсор в продължение на 24 часа. Оцветяване чрез двойно флуорохромиране с акридин оранж/пропидиев йодид. Флуоресцентен микроскоп Leica DM5000B, увеличение 200х.

Култивираните в присъствие на прекурсора Ru(II) клетки запазват своята виталност въпреки увеличената по обем цитоплазма и формираните в част от клетките големи вакуоли. Комплексът Ru Valpnol в концентрация 5µg/ml предизвиква силно раздуване на цитоплазмата и груба дисперсия на ядрения хроматин, а при невиталните клетки, маркирани с пропидиев йодид, се наблюдава свиване на цитоплазмата и формиране на апоптотични телца по клетъчната повърхност. Убедителни белези на ранна апоптоза са регистрирани при третиране в продължение на 24 часа с RuValpnol в концентрация 10µg/ml – при запазена виталност на клетките ядреният хроматин е агрегиран,

клетъчната мембрана е ангажирана в образуваните апототични телца. За третираните с Ru Valdiamci клетки са характерни запазването на целостта на клетъчния монослой въпреки преобладаването на невитални клетки с апототични белези и изразеният полиморфизъм спрямо контролата нетретираните клетки (Фигура 13).



Фигура 14. Клетки от линия HeLa, третиран в продължение на 24 часа с комплексите RuValpnol и RuValdiamci и техният прекурсор в продължение на 24 часа. Оцветяване чрез двойно флуорохромиране с акридин оранж/пропидиев йодид. Флуоресцентен микроскоп Leica DM5000B, увеличение 200х.

При клетки от карцином на маточната шийка у човек (клетъчна линия HeLa) се наблюдават ясно изразени промени в морфологията на клетките след третиране с изследваните от нас комплекси на Ru(II)/(III) в продължение на 24 часа.

Прекурсорът, приложен в концентрация 50 µg/ml, предизвиква значително редуциране на клетъчния монослой, като преобладават невитални клетки, пропускливи за пропидиев йодид. Цитоплазмата е със заличена морфология, ядрата за полиморфни, хроматинът е грубо диспергиран.

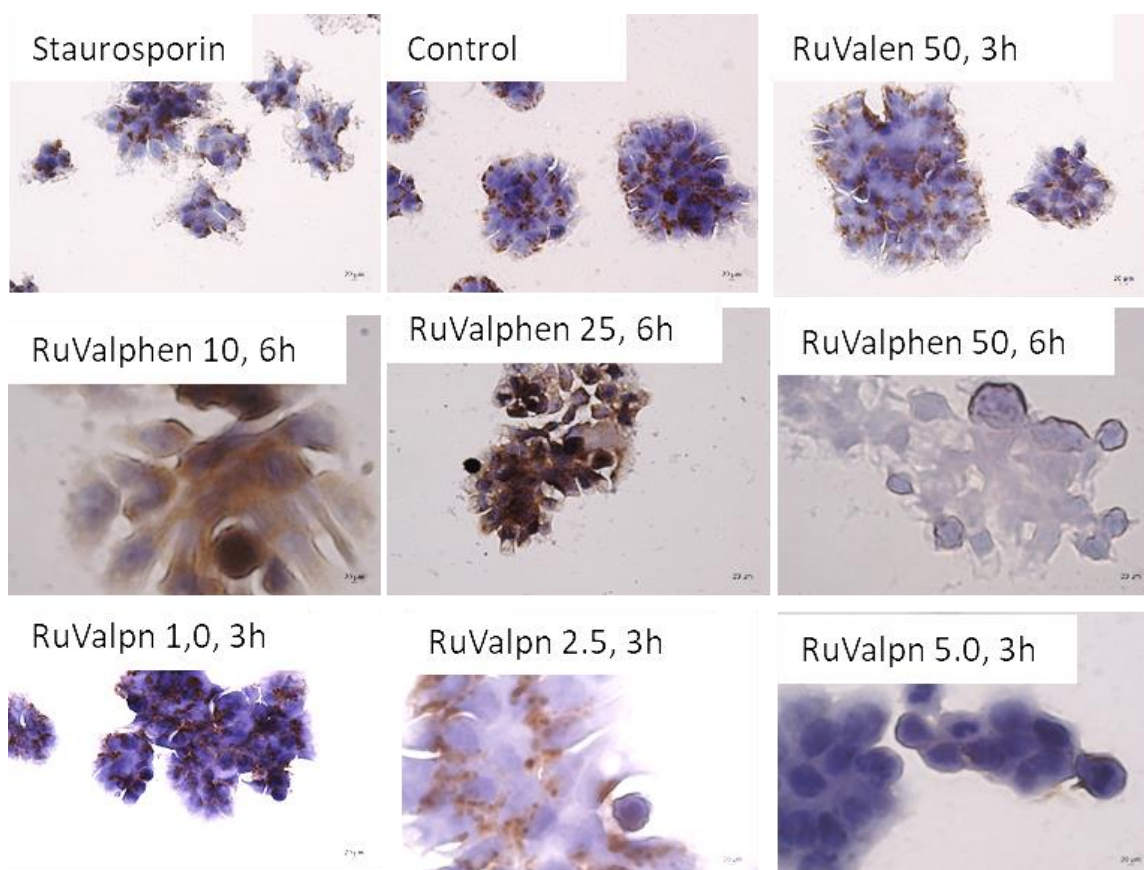
Клетките, третиран с комплексите RuValpnol (приложен в концентрации 5-10 µg/ml) и RuValdiamci (концентрация 1 µg/ml), показват белези на апототична

клетъчна смърт с формиране на характерни „блебове“ по повърхността на клетъчната мембрана и хроматинови агрегати в ядрата (Фигура 14).

Доказване на ранна апоптоза при мембранна експресия на маркера AnnexinV, имуноцитохимична реакция с моноклонално антитяло (abcam 140068), визуализирана с DAB-хромоген.

Анексин V е клетъчен протеин от групата на анексините. Прилага се за откриване на ранна апоптоза чрез способността му да се свързва с фосфатидилсерин, чиято локализация върху външната повърхност на клетъчната мембрана е маркер за започнали апоптотични процеси в клетката.

Чрез имуноцитохимична реакция с Annexin V беше проследено изместването на локализацията от цитоплазмата към клетъчната мембрана при третиране с изследваните от нас комплекси на рутений с шифови бази и така беше установен времеви интервал за стартиране на ранна апоптоза – между 3-ия и 6-ия час след началото на третирането. Много добре изразена мембранна реакция беше установена на 6-ия час от третиране на остеосаркомни клетки от линия Saos-2 с комплекса RuValphen (10-50 µg/ml) и на 3-ия час при RuValpn (5 µg/ml), Фигура 15.



Фигура 15. Клетки от линия Saos-2, третирани с комплексите RuValen, RuValphen и RuValpn в продължение на 3-6 часа; Имуноцитохимична реакция с моноклонално анти тяло AnnexinV (abcam 140068), визуализирана с DAB-хромоген. Микроскоп Leica DM5000B, увеличение 200x

Изследване на потенциалната способност на комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази да предизвикват автофагия

Автофагията е генетично програмиран, еволюционно устойчив механизъм за клетъчна самозащита и морфологично се характеризира с образуване на двойномембранны автофагични везикули – автофагозоми. Те обхващат части от цитозола, увредени органели, дефектни протеини или бактерии, сливат се с лизозоми и съдържанието им се катаболизира.

Няма абсолютни критерии за определяне на автофагичния статус, които да са приложими във всеки биологичен или експериментален контекст. Автофагията винаги присъства на базово ниво в дадена клетъчна система и за точно анализиране на автофагичния поток е необходимо да се измерва промяната при различни условия.

С прилагане на ултраструктурни изследвания с трансмисионна електронна микроскопия (ТЕМ) бяха проведени *in vitro* изследвания върху способността на

тестираните съединения на Ru(II)/(III) с шифови бази за предизвикване на автофагия при експериментален модел – постоянна клетъчна линия MDA-MB-231 (Тройнонегативен карцином на гърдата).

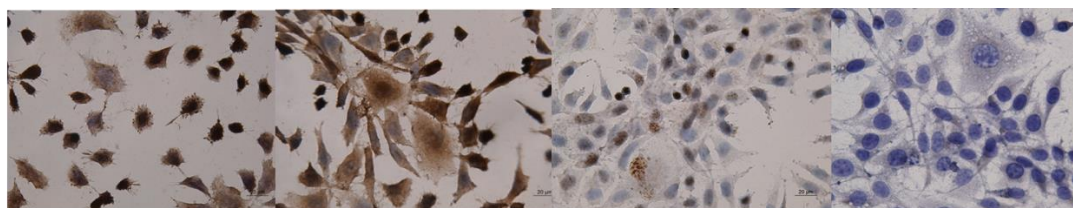
За изследваните комплекси на Ru(III) с шифови бази, се установява, че концентрациите, при които след 24-часово третиране се регистрира формиране на автофагозоми, са близки до IC_{50} и дори до IC_{90} при 72-часово третиране. Въз основа на това можем да направим обосновано предположение, че стартиралата автофагия завършва с клетъчна смърт.

Изготвянето на препаратите, заснемането на електонномикроскопските изображения и интерпретацията на резултатите бяха извършени благодарение на доц. д-р Катерина Димитрова, ИЕМПАМ-БАН.

Имуноцитохимична детекция на белтъка LC3B с моноклонално антитяло и визуализация с DAB хромоген за светлинна микроскопия

Имунодетекцията на автофагични протеини (особено LC3 и BECN1) се използва като прогностичен фактор при различни човешки карциноми - карцином на гърдата, ендометриален аденокарцином, плоскоклетъчен карцином на главата и шията, хепатоцелуларен карцином, глиоми, лимфоми, недребноклетъчен карцином на белия дроб, карцином на панкреаса. LC3 е най-широко използваният маркер за автофагозоми. Микротубулно-асоциираният протеин LC3–1A/1B Light-chain protein 3B при човека се кодира от гена MAP1LC3B (16 хромозома). Член е на високо консервираното ATG8 протеиново семейство – тези протеини присъстват във всички известни еукариотни организми. За първи път е изолиран от мозък на плъх. LC3 е ключов протеин за сигналните пътища на автофагията и е активен при селекцията на субстрата на автофагия и при формирането на автофагозоми. Фагозомалният маркер LC3B (Atg8) се визуализира като дифузен цитоплазмен пул или като точкови структури, представляващи автофагозоми, имунохистохимично с HRP-реакция и DAB-хромоген или чрез флуоресцентна конфокална микроскопия (GFP-LC3 или реакция с монодансилкадаверин). Едно от основните предизвикателства при използването на имуноцитохимични методи за доказване на LC3B е, че в някои тъкани този протеин може да бъде локализиран в структури, различни от автофагозомите, включително в ядрото и в липидни капчици.

A.



Control
MDA-MB-231
Rapamycin-3h,
LC3B

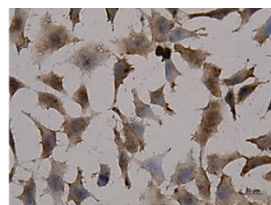
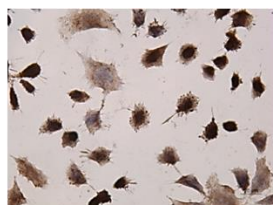
Control
MDA-MB-231
Rapamycin-6h,
LC3B

Control
MDA-MB-231
Rapamycin-24h,
LC3B

Control
MDA-MB-231
Rapamycin 48h
LC3B

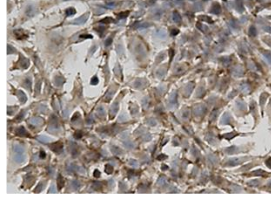
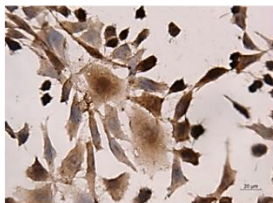
B.

Control MDA-
MB-231
Rapamycin-3h,
LC3B



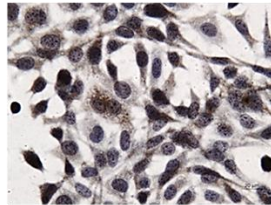
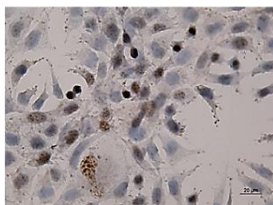
MDA-MB-231
RuSalpn -2,5µg/ml
-3h, LC3B

Control
MDA-MB-231
Rapamycin-6h,
LC3B



MDA-MB-231
RuSalpn -
2,5µg/ml
-6h, LC3B

Control MDA-
MB-231
Rapamycin-24h,
LC3B



MDA-MB-231
RuSalpn -
2,5µg/ml
-24h, LC3B

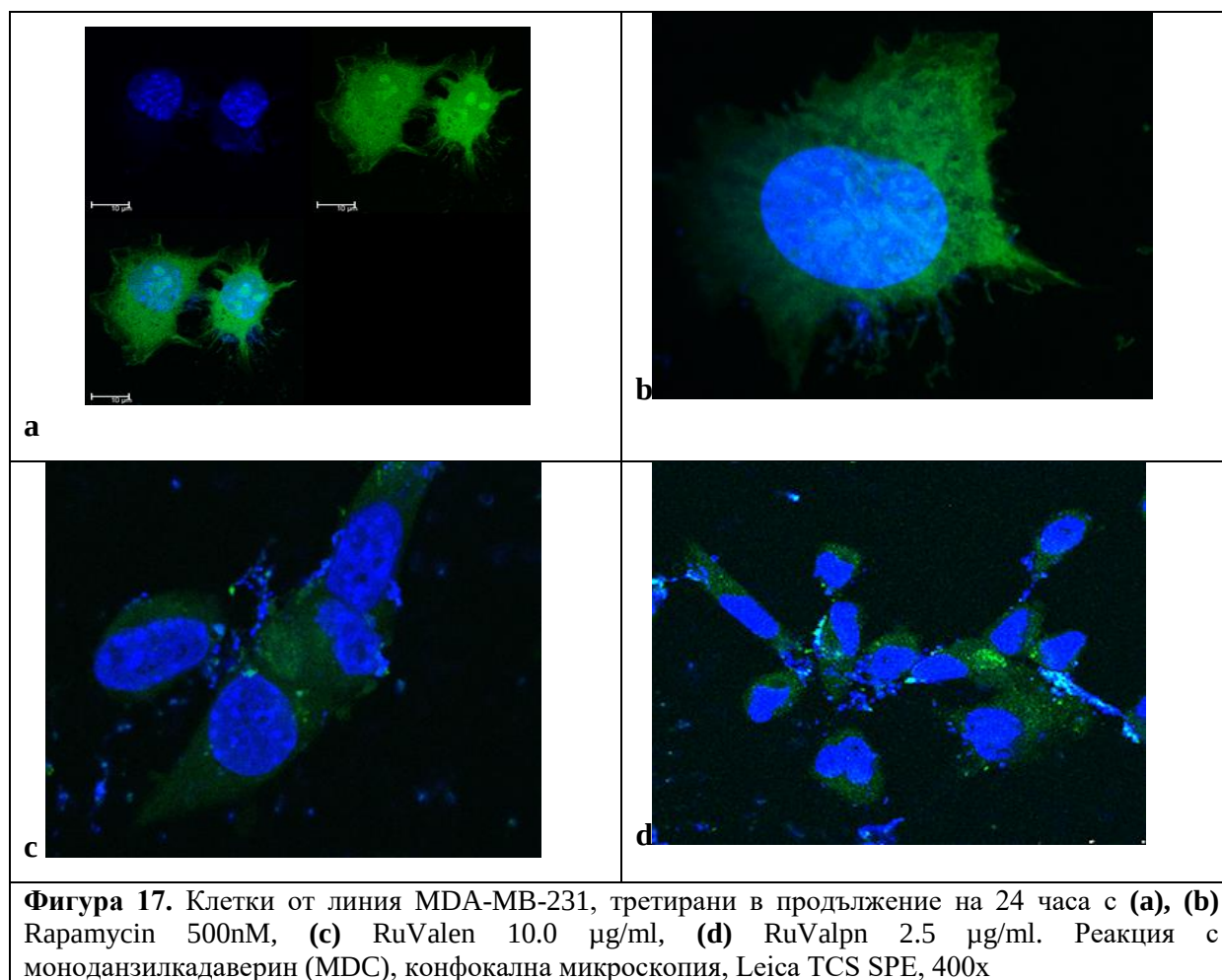
Фигура 16. Клетки от карцином на гърдата при човек (клетъчна линия MDA-MB-231), третирани с индуктор на автофагия (Rapamycin) **(A)** в концентрация 500 nM за различни времеви интервали (3, 6, 24, 48 часа) и **(B)** при третиране с 2,5 µg/ml RuSalpn. Имуноцитохимична реакция с поликлонално антитяло срещу белтъка LC3B, визуализация с хромоген DAB (Diaminobenzidine), Микроскоп Leica DM5000B, 200x

Конфокална микроскопия

За провеждането на този тип изследване беше оптимизиран протокол за работа с кит CYTO-ID® Autophagy detection kit (Enzo Life Sciences, Inc., USA). Автофагозомни грануляции на цитоплазмата бяха наблюдавани при клетъчна линия HeLa (Цервикален карцином у човек) и MCF7 (Карцином на гърдата у човек) при третиране с индуктора на автофагия Rapamycin в нетоксина концентрация 500 nM. Изследваните комплекси на

рутений предизвикват значително по-слабо активизиране на автофагичните процеси. На Фигура 17 са показани флуоресцентни микрофотографии от лазерен сканиращ микроскоп (система за конфокална микроскопия Leica TCS SPE).

Изследванията с конфокална микроскопия бяха извършени със съдействието на доц.Милена Мурджева, доктор, Институт по биология и имунология на размножаването “Акад.Кирил Братанов” – БАН.

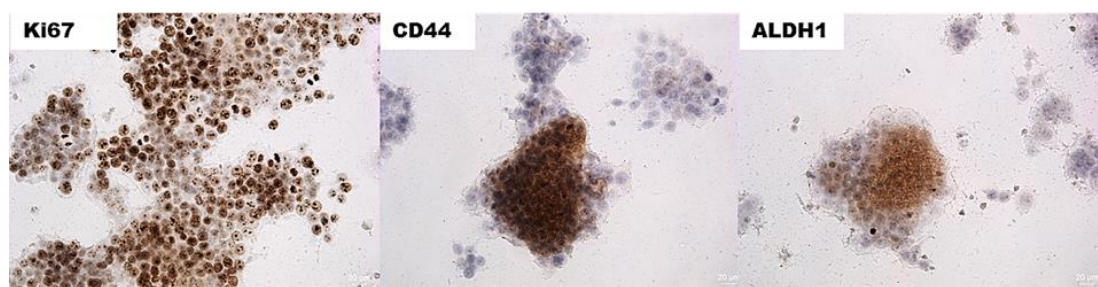


За изпитваните комплекси на Ru(III) с шифови бази, приложени при клетки от изследваните туморни клетъчни линии се установява, че стартиралата в началните 3-24 часа от третирането автофагия завършва с клетъчна смърт.

Детекция на клетъчни популации с фенотип на туморни стволови клетки

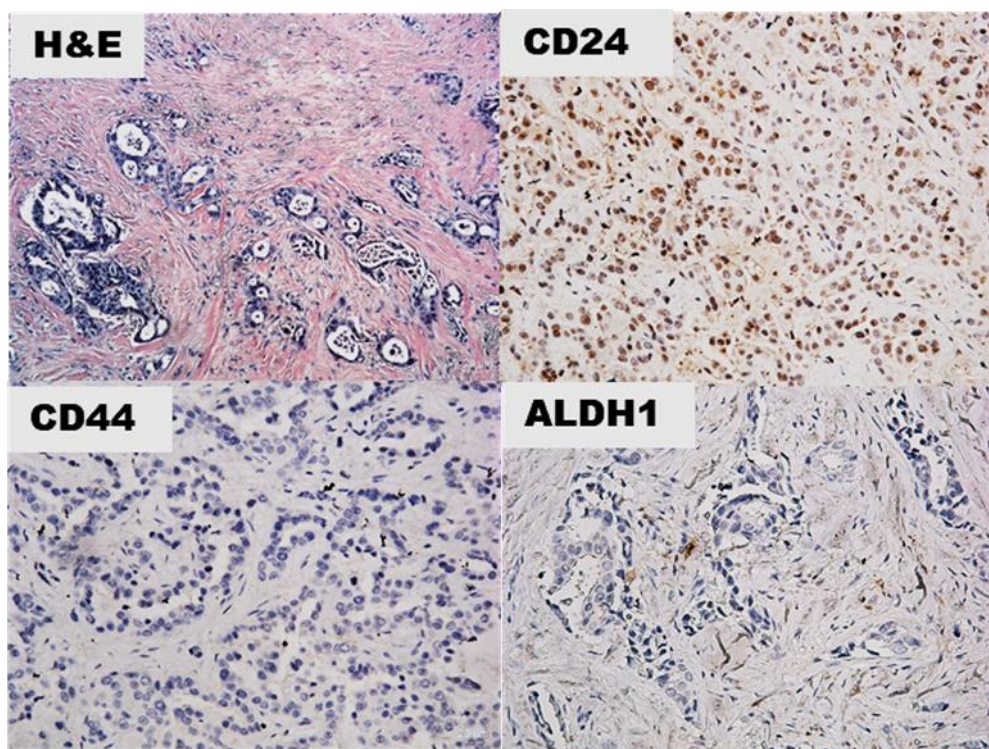
Туморните стволови клетки при карцином на млечната жлеза имат фенотип CD44⁺/CD24^{low} и свръхекспресия на определящия за клетъчната диференциация ензим Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1). Проучването за наличие на туморни клетки със стволот фенотип беше извършено при клетъчни линии от карцином на гърдата при човек с различни профили на експресия на маркерите, характеризиращи биологичното поведение на мамарните карциноми (MCF-7, MDA-MB-231). Също така бяха подбрани тъканни проби от инвазивни карциноми на млечната жлеза, фиксирани във формалини и включени в парафин. Хистологичните материали са прегледани и диагнозите са препотвърдени от клиничен патолог със специализация в областта на мамарната патология при човека, като туморите са характеризирани по отношение на техния размер, хистологичен клас, наличие на регионални метастатични лимфни възли и далечни метастази. Изследваните тъканни проби са от първичните огнища на инвазивни дуктални карциноми (метастатични и неметастатични първични инвазивни дуктални карциноми, туморни рецидиви), лимфни възли (метастатични и свободни от метастази), далечни метастази (костни). Идентифицирането на туморни клетки със стволот фенотип при клетъчни линии от карцином на млечната жлеза (MCF7 и MDA-MB-231) и в тъканни проби от инвазивен дуктален карцином беше извършено чрез имухисто/имуцитохимично проследяване експресията на мембранните маркери (CD44 и CD24) и на цитоплазмено локализиращия ензим ALDH1. За целта бяха използвани моноклонални антитела (Quartett Immunodiagnostika, Германия).

От изследваните клетъчни линии от карцином на млечната жлеза (MDA-MB-231 и MCF7) и от нетуморна мамарна тъкан (MCF10), клетъчни популации със стволот фенотип CD44⁺ CD24⁻ /low ALDH1⁺ бяха идентифицирани при клетъчна линия MCF7, получена от плеврално метастазирал инвазивен карцином на млечната жлеза (луминален тип A). Един от недостатъците на постоянните клетъчни линии е именно изменената експресия на специфични маркери (особенно на адхезионни протеини, каквито са CD44 и CD24) в процеса на дългогодишно лабораторно култивиране (Фигура 18).



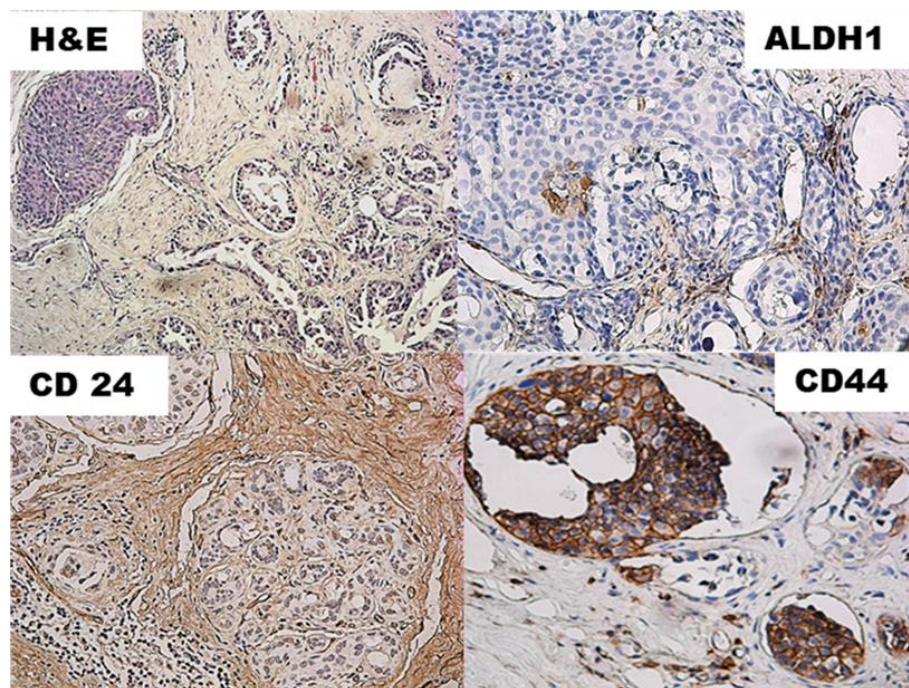
Фигура 18. Позитивни маркери при клетъчна линия MCF7 (плеврално метастазирал инвазивен карцином на млечната жлеза (луминален тип A). Имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу Ki67, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)

Тъканните проби от карциноми на млечната жлеза, които към момента на хирургичното им отстраняване не са придружени от регионални метастатични лимфни възли, имат профил $CD44^-/CD24^+/ALDH1^-$ (Фигура 19). Изследваните аксиларни лимфни възли са без метастази и не показват експресия на CD44 и ALDH1.

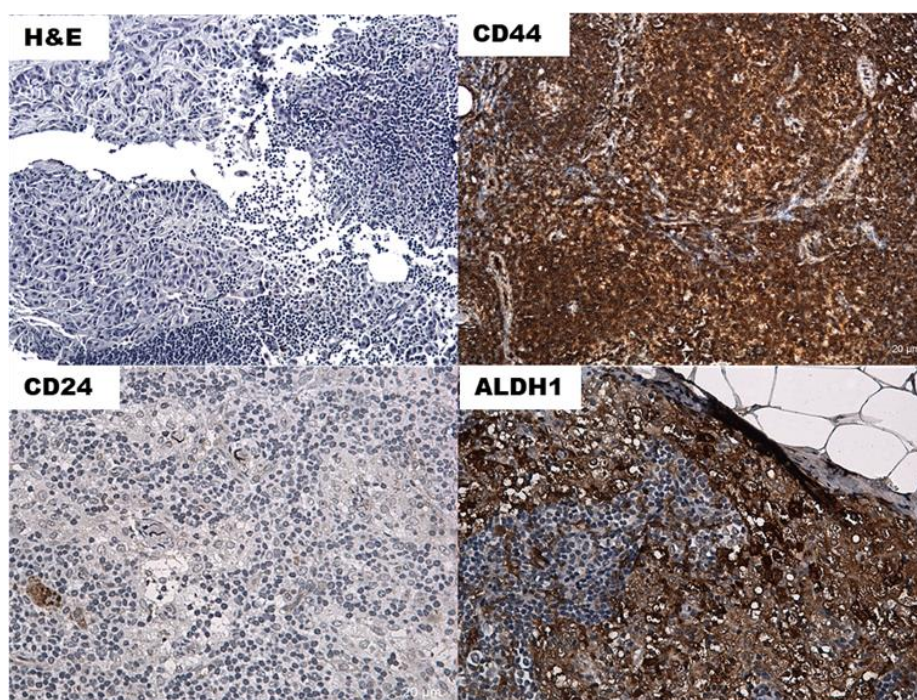


Фигура 19. Инвазивен дуктален карцином на гърдата без метастази. Оцветяване с H&E и имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу CD24, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)

Метастазиралите тумори и техните метастатични регионални лимфни възли показват експресия на стволов фенотип - $CD44^+/CD24^-/ALDH1^+$ при повече от 10% от туморните клетки (Фигура 20 и 21).

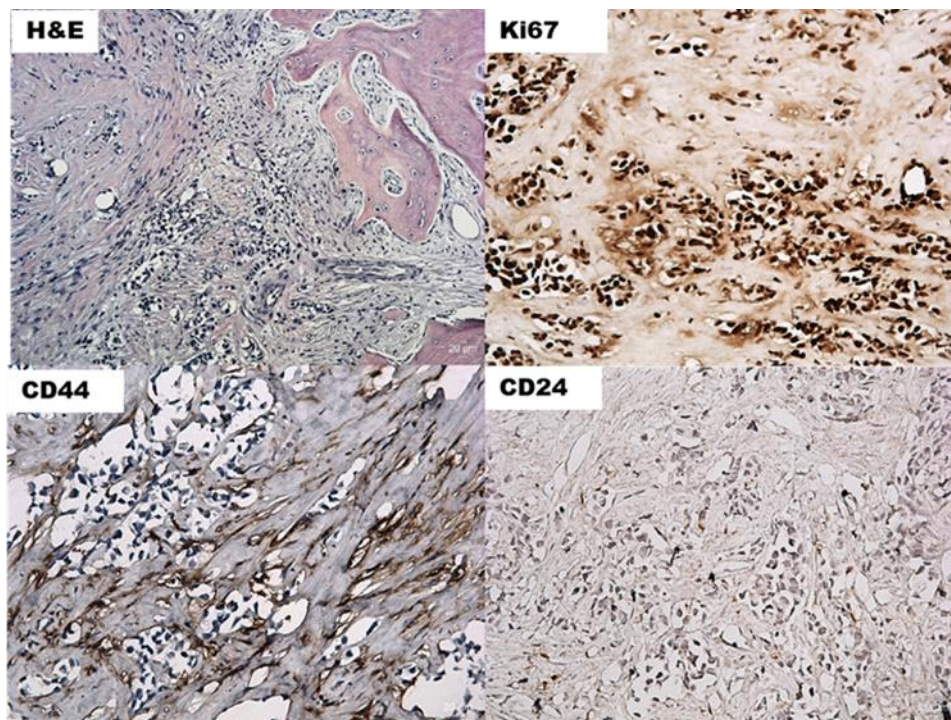


Фигура 20. Инвазивен дуктален карцином на гърдата с метастатични регионални лимфни възли. Оцветяване с H&E и имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу CD24, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)



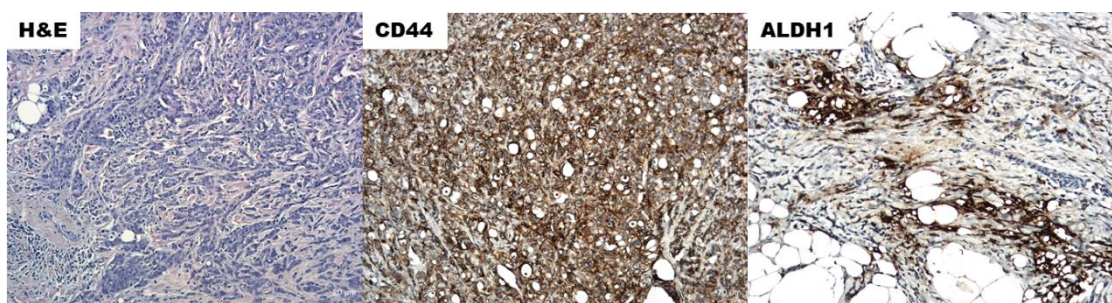
Фигура 21. Метастатичен лимфен възел от инвазивен дуктален карцином. Оцветяване с H&E и имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу CD24, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)

Далечните костни метастази проявяват експресия на CD44 и имат фенотипен профил CD44+/CD24-/ALDH1- (Фигура 22).



Фигура 22. Далечна метастаза (femur) от инвазивен дуктален карцином на гърдата. Оцветяване с H&E и имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу CD24, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)

При проучените локорегионални туморни рецидиви без наличие на регионални и далечни метастатични огнища, също беше идентифицирана клетъчна популация (5-10% от туморните клетки) със стволов фенотип (Фигура 23).



Фигура 23. Локорегионален рецидив на инвазивен дуктален карцином. Оцветяване с H&E и имуноцитохимична реакция с моноклонални антитела срещу CD24, CD44 и ALDH1, визуализация с хромоген DAB (Микроскоп Leica DM5000B, 200x)

Обстойният анализ на получените резултати прави видима връзката между наличието на туморна клетъчна популация със стволов фенотип CD44⁺/CD24⁺/ALDH1⁺ и възникването на регионални и далечни метастатични огнища, както и с развитието на туморен рецидив. Определянето на експресията на тези маркери в първия получен

хистологичен материал (tru-cut биопсия) в процеса на диагностиката би било с висока информативна стойност по отношение на биологичното поведение на тумора, по-специално за оценка на метастатичния му потенциал.

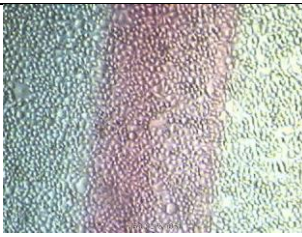
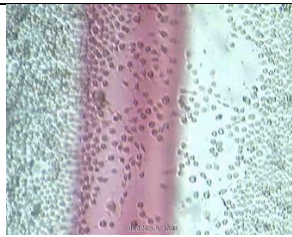
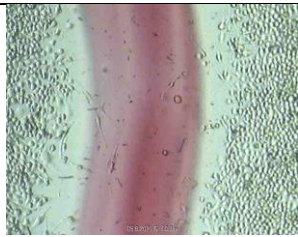
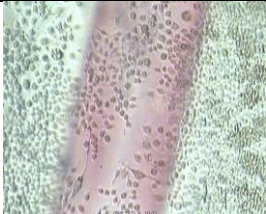
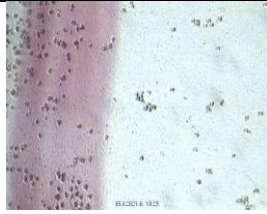
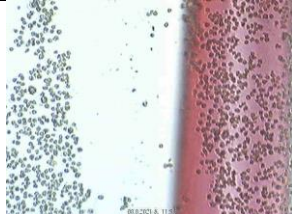
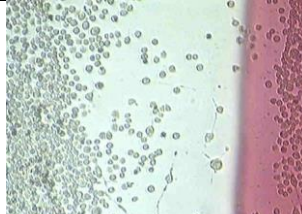
Поради своя туморогенен потенциал, участието си в метастазирането и формирането на фенотип на лекарствена резистентност, туморните стволови клетки се очертават като потенциална терапевтична мишена при лечението на карцинома на гърдата, тъй като таргетиране им с цел намаляване на лекарствената резистентност и туморните рецидиви би било полезно за увеличаване на преживяемостта на пациентите

В нашето проучване беше приложено имунохистохимично изследването на експресията на биомаркерите, идентифициращи туморните стволови клетки при карцином на гърдата CD44, CD24 и ALDH1 на стандартно получени хистологични проби - фиксирани с формалин и включени в (FFPE), без да е необходима подготовка на отделни образци за имунофлуоресцентно изследване, както се посочва в актуални литературни източници. Достъпността и утвърденото диагностично приложение на използваната от нас стандартна методика за имунохистохимична верификация на експресията на тъканни биомаркери ще допринесе за приложението на концепцията за ТСК в клиничната практика, а установяването на биологичните характеристики на туморните стволови клетки може да послужи за прогностични и диагностични цели.

Определяне влиянието на комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази върху миграционната способност на туморни клетъчни линии

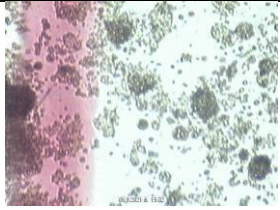
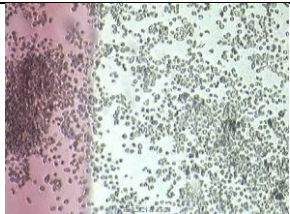
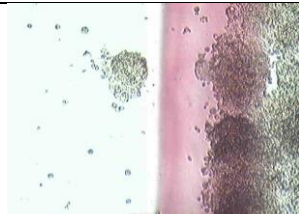
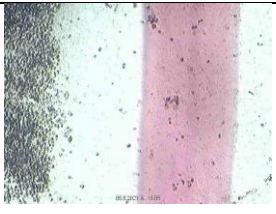
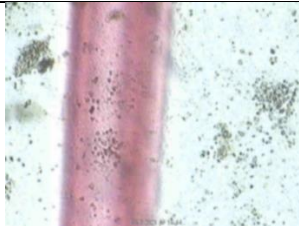
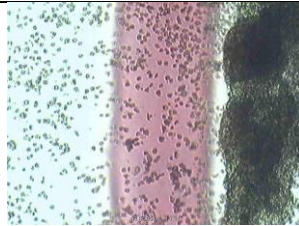
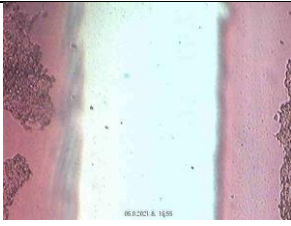
Миграционният капацитет на туморните клетки играе важна роля в редица процеси от развитието на туморите, като неоангиогенеза и метастазиране. В тази връзка е важно да се определи ефектът на новосинтезираните комплекси на Ru(II)/(III) върху миграцията на туморните клетки. Тестът за заздравяване на рани (wound healing) след отстраняване на ивица от клетъчния монослой чрез скарификация ("scratch") дава възможност да се наблюдава промяната в миграционната способност на клетките, като в края на 48-часовото въздействие с изследваните вещества се анализира ширината на ексфолираната преди третирането зона. Клетките от двете страни на дракотината се придвижват към празната зона, като по този начин се демонстрира способността им да мигрират.

Отчитането на резултатите се извърши с инвертен светлинен микроскоп (Carl Zeiss Jena, Germany). Документирани чрез микрофотографии резултати са представени на фигури 24 и 25.

Control 48h	RuSalphen,1 µg/ml	RuSalphen, 5 µg/ml	RuSalphen,10 µg/ml
			
RuSalen, 25 µg/ml	RuSalpn,1 µg/ml	RuSalpn,25 µg/ml	RuValen, 100µg/ml
			
RuValphen, 25 µg/ml	RuValpn, 25 µg/ml	RuValdiamci 100µg/ml	Precursor, 100µg/ml
			
Фигура 24. Потискане на миграционния капацитет на клетки от линия LSR-SF-SR след 48-часово третиране с комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази. Инвертен микроскоп Carl Zeiss Jena, камера CAM 2800-XP 2.0, Увеличение 40х.			

При плъщи саркомни клетки от линия LSR-SF-SR комплексите RuSalen, (в концентрация $\geq 25 \mu\text{g/ml}$), RuSalphen ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$), RuSalpn ($\geq 25 \mu\text{g/ml}$) и RuValen ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) поддържат най-голяма площ на раневия дефект и проявяват изразен инхибиращ ефект върху миграцията. Пълно потискане на миграционния капацитет се наблюдава при третиране с комплексите RuValphen и RuValpn в концентрация $\geq 25 \mu\text{g/ml}$, RuValpnol и RuValdiamci ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) (Фигура 24).

При клетъчна линия HT29 (колоректален карцином у човек) запазена ширина на скарификационната рана и изявено потискане на миграционната активност на клетките се установява под въздействие на комплексите RuSalphen ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$), RuValphen ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) и прекурсора Ru(II) при концентрация ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) (Фигура 25).

Control 48h	RuSalphen, 5 $\mu\text{g/ml}$	RuSalpn, 100 $\mu\text{g/ml}$	RuValen, 100 $\mu\text{g/ml}$
			
RuSalen, 10 $\mu\text{g/ml}$	RuSalen, 100 $\mu\text{g/ml}$	RuValpn, 100 $\mu\text{g/ml}$	RuValphen, 100 $\mu\text{g/ml}$
			
RuValpnol, 100 $\mu\text{g/ml}$	RuValdiamci, 25 $\mu\text{g/ml}$	RuValdiamci, 100 $\mu\text{g/ml}$	Precursor, 100 $\mu\text{g/ml}$
			

Фигура 25. Потискане на миграционния капацитет на клетки от линия HT29 след 48-часово третиране с комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази. Инвертен микроскоп Carl Zeiss Jena, камера CAM 2800-XP 2.0, Увеличение 40х.

Дългосрочни експерименти с 3D-клетъчни култури

Определяне на 3D-колонии формираща способност при туморни клетъчни линии, третирани с изследваните комплекси на рутений с шифови бази

Изследвано беше влиянието на 8 новосинтезирани комплекса на Ru(III) с шифови бази и техния прекурсор Ru(II) върху способността на използваните като моделни системи туморни клетки да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда. Получените резултати са обобщени в Таблицы 6 и 7. Първите триизмерни колонии, изградени от поне 10-12 клетки, бяха забелязвани в контролите обикновено към 4-5 ден. Получените резултати показаха, че комплексът RuSalpn, приложен в концентрация 5 $\mu\text{g/ml}$ напълно потиска 3D колонии - образуващата способност на туморните клетки от линии Saos-2, HeLa и LSR-SF(SR), като само неговата КИК е ≥ 5 $\mu\text{g/ml}$ (Таблица 6). При прекурсора такова потискане се наблюдава при концентрации ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$ (≥ 200 $\mu\text{g/ml}$ при клетъчна линия HT29), а за останалите комплекси колонии-инхибиращи концентрации (КИК) са в диапазона 10-50 $\mu\text{g/ml}$. КИК е концентрацията, при която няма формирани колонии, наблюдават се само единични клетки или липса на клетки.

Таблица 6. 3D-колонии-инхибиращи концентрации (КИК, $\mu\text{g}/\text{m}$) на комплекси на Ru(II)/(III) с Шифови бази при клетки от линия HT29, Saos, HeLa и RST (LSR-SF-SR)

Период на проследяване, дни	Изследван комплекс	3D колонии инхибиращи концентрации, (КИК, $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		Клетъчна линия			
		HT29	Saos-2	HeLa	LSR-SF-SR
41	Precursor	≥ 200.0	≥ 50.0	≥ 100.0	≥ 100.0
43	Ru Salen	≥ 50.0	≥ 25.0	≥ 25.0	≥ 10.0
43	Ru Salphen	≥ 50.0	≥ 25.0	≥ 50.0	≥ 25.0
43	Ru Salpn	≥ 25.0	≥ 5.0	≥ 5.0	≥ 5.0
42	Ru Valen	≥ 50.0	≥ 10	≥ 25.0	≥ 10
42	RuValphen	≥ 100.0	≥ 10	≥ 25.0	≥ 10.0
42	RuValpn	≥ 25.0	≥ 2.5	≥ 25.0	≥ 12.5
41	RuValpnol	≥ 50.0	≥ 5.0	≥ 10.0	≥ 5.0
41	RuValdiamci	≥ 50.0	≥ 10.0	≥ 10.0	≥ 10.0

При дългосрочни тестове за 3D-колонии-образуваща способност на туморни клетки от карцином на гърдата у човек (клетъчни линии MCF7 и MDA-MB-231) бяха получени следните резултати, систематизирани в Таблица 7. Ниска КИК ($\geq 5.0\mu\text{g}/\text{ml}$) беше установена за комплексите RuSalpn, RuValen, RuValpn и RuValpnol за клетъчна линия MDA-MB-231 и само за RuValpnol при клетъчна линия MCF7.

Таблица 7. 3D-колонии-инхибиращи концентрации (КИК, $\mu\text{g/ml}$) на комплекси на Ru(II)/(III) с Шифови бази при клетки от линии MCF7 и MDA-MB-231

Период на проследяване, дни	Метален комплекс	3D колонии-инхибиращи концентрации , (КИК, $\mu\text{g/ml}$)	
		MDA-MB-231	MCF7
43	Precursor	≥ 100.0	≥ 100.0
43	Ru Salen	≥ 50.0	≥ 50.0
43	Ru Salphen	≥ 50.0	≥ 50.0
43	Ru Salpn	≥ 5.0	≥ 25.0
43	Ru Valen	≥ 5.0	≥ 25.0
43	Ru Valphen	≥ 10.0	≥ 25.0
43	Ru Valpn	≥ 5.0	≥ 10.0
43	Ru Valpnol	≥ 5.0	≥ 5.0
43	Ru Valdiamci	≥ 50.0	≥ 10.0

4.2 Експериментите с първични туморни култури

Изолирани бяха клетки от 12 инвазивни дуктални карцинома на млечната жлеза (10 първични и 2 туморни рецидива) и от 2 мезенхимни малигнени тумора (миксоиден липосарком и дребноклетъчен остеосарком на бедрото). Тъканните материали представляваха нефиксирана туморна тъкан с обем 2-3 cm^3 , резецирана при стандартно оперативно отстраняване на тумора, като след преценка от клиничен патолог беше подбран участък от солидната туморна зона без некротични участъци.

Информация за броя, процентния дял и средния размер на живите клетки в получените клетъчни суспензии от туморна тъкани са получени след оцветяване с трипаново синьо чрез изброяване с електронен клетъчен брояч (Invitrogen™ Automated Cell Counter) и са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Брой, процентен дял и среден размер на живите клетки в получените клетъчни суспензии от туморни тъкани. Броят на живите клетки и средните им размери са определени след оцветяване с трипаново синьо чрез изброяване с електронен клетъчен брояч (Invitrogen™ Automated Cell Counter).

№	Общ брой клетки в 1 мл	% живи клетки	Среден размер на живите клетки, μm
1	$2,3 \times 10^6$	21	8,1
2	$5,4 \times 10^5$	57	8,7
3	$7,2 \times 10^6$	14	10,7
4	$1,5 \times 10^6$	33	8,7
5	$1,0 \times 10^7$	51	9,3
6	$6,6 \times 10^6$	60	6,6
7	$3,4 \times 10^6$	76	9,8
8	$3,9 \times 10^6$	40	15,2
9	$8,3 \times 10^5$	51	12,9
10	$8,8 \times 10^5$	52	12,3
11	$3,2 \times 10^6$	72	11,7
12	$1,3 \times 10^6$	38	9,8
13	$4,0 \times 10^5$	55	10,4
14	$6,2 \times 10^6$	83	12,7

Така подготвените клетъчни суспензии бяха прехвърляни в матраци с обем 25 cm^3 (1×10^6 клетки в един матрак) и бяха култивирани в CO_2 инкубатор при 37°C и 95 % влажност.

Направени бяха контролни микробиологични посевки, които не показаха растеж.

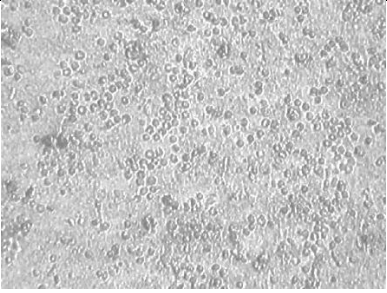
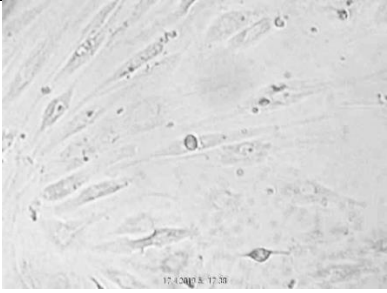
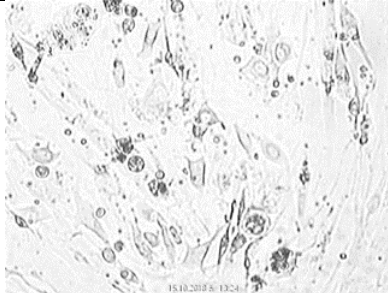
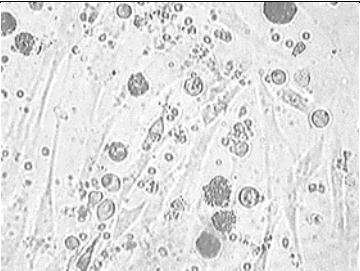
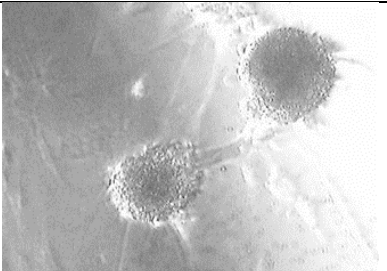
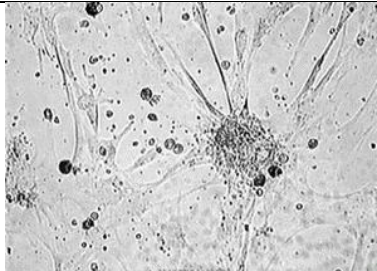
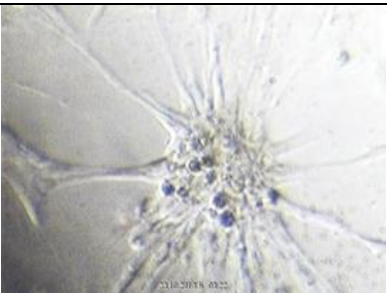
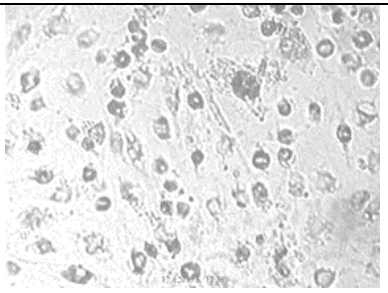
Основните характеристики на получените първични туморни клетки и особеностите на тяхното култивиране и развитие са представени в Таблица 9.

Таблица 9. Характеристика на туморните тъкани и продължителност на култивиране на изолираните от тях първични клетъчни култури

№ на клетъчна култура	Тумор	Тъканни експланти, брой	Оформяне на монослой/ден култивиране	Брой пасажи/ продължителност на култивиране
1	Инвазивен дуктален карцином на гърдата HER2 (+) ER 75% PR 25%	4	3	28 пасажа/197 дни
2	Рецидив на дукто-лобуларен карцином на гърдата – HER2 (-) ER 75% PR (-)	1	8	3 пасажа/32 дни клетките престанаха да се делят, по-късно загубиха адхерентност и загинаха
3	Дукто-лобуларен карцином на гърдата T _{1b} N ₁ M ₀ G ₂ HER2 (-) ER (-) PR (-)	4	3	28 пасажа/190 дни
4	Инвазивен дуктолобуларен карцином на гърдата T ₂ N ₁ M ₀ G ₂ HER2 (-) ER 75% PR 75%	1	3	10 пасажа/ 64 дни, клетките престанаха да се делят, по-късно загубиха адхерентност и загинаха
5	Инвазивен дуктален карцином с тубуларна компонента T ₂ N ₀ M _x G ₂ HER2 (-) ER 75% PR 75%	1	2	Клетките бяха пролиферативно активни. Култивирането беше прекратено по технически причини след 5 пасажа
6	Инвазивен дуктален карцином T ₂ N ₂ M _x G ₂₋₃ HER2 (+) ER 75% PR 50%	2	3	31 пасажа/150 дни
7	Инвазивен дуктолобуларен карцином T ₁ N ₁ M _x G ₂ HER2 (-) ER % PR %	2	3	25 пасажа/150 дни
8	Инвазивен дуктален карцином на гърдата HER2 (+) ER 75% PR 25%	1	6	11 пасажа/56 дни

9	Дукто-лобуларен карцином на гърдата – рецидив HER2 (+) ER 50% PR 25%	1	5	23 пасажа/95 дни
10	Рецидив от инвазивен дуктален карцином на гърдата HER2 (-) ER 100% PR 75%	1	7	9 пасажа/43 дни
11	Инвазивен дуктален карцином на гърдата T ₂ N ₁ M ₀ G ₂ HER2 (-) ER 100% PR 50%	1	5	19 пасажа//73 дни
12	Инвазивен дуктален карцином на гърдата T ₁ N ₁ M ₀ G ₂ HER2 (-) ER 75% PR 50%	1	6	16 пасажа/64 дни
13	Дребноклетъчен остеосарком на бедрото	1	5	3 пасажа/22 дни
14	Миксоиден липосарком на бедрото	1	2	11 пасажа/52 дни

Първата смяна на хранителната среда беше извършвана след 24 часа с цел да се отстранят мъртвите клетки и да се предотврати негативното влияние на разградните продукти. Формирането на монослой беше отчитано ежедневно (инвертен микроскоп Karl Zeiss Jena, Germany) и обикновено беше наблюдавано между 3 и 7 дни след посяването в матрици. Клетките бяха пасирани през 3-5 дни със смес от 0.05% трипсин и 0.025% етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA), като при всеки пасаж беше извършено преброяване на клетките с определяне на % живи клетки. Матраците бяха преглеждани ежедневно микроскопски и беше оценявана морфологията на клетките, адхезионната им способност и плътността на клетъчния монослой (Фигура 26). Не беше констатирана микробна контаминация на клетъчните култури.

Първична култура № 1– 2-ри и 28-ми пасаж		Първична култура № 2, 2-ри пасаж
		
Първична култура №3 - 2-ри и 29-ти пасаж		
		
2-ри пасаж, 18-ти ден	3-ти пасаж, 18-ти ден	
		
3-ти пасаж, 18-ти ден		29-ти пасаж, 163-ти ден

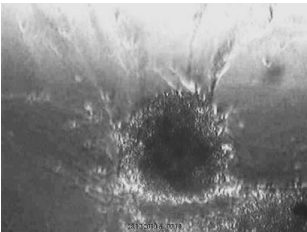
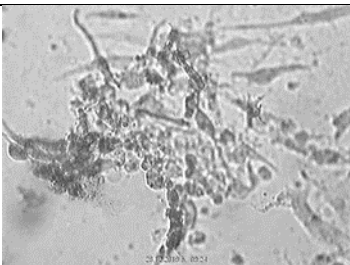
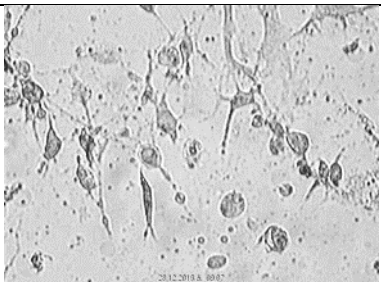
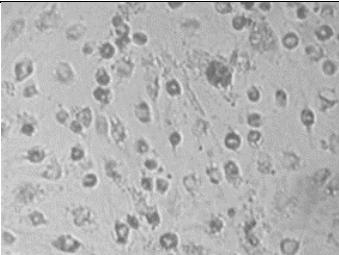
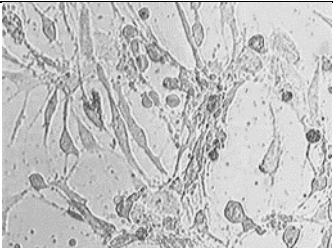
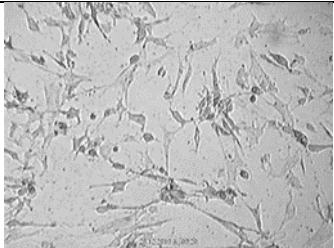
Фигура 26. Нетретираны клетки (първични култури №1, 2 и 3), изолирани от инвазивен дуктален карцином на 2-ри, 3-ти и 29-ти пасаж. Инвертен микроскоп Carl Zeiss Jena, камера CAM 2800-XP 2.0, Увеличение 40х.

При първоначалните експерименти изолираните туморни клетки бяха намножавани и пасирани максимално дълго време с цел да се проследи продължителността на запазена пролиферативната активност.

В следващи експерименти се пристъпваше възможно най-скоро към изпитване чувствителността на изолираните първични култури към утвърдени химиотерапевтици и част от изследваните комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази. Посяването в 96-ямкови плаки за третиране беше правено след 2-4 пасаж (от 5 до 14 дни след получаването на туморната тъкан). Цитотоксичният ефект беше отчитан на 24, 48 и 72

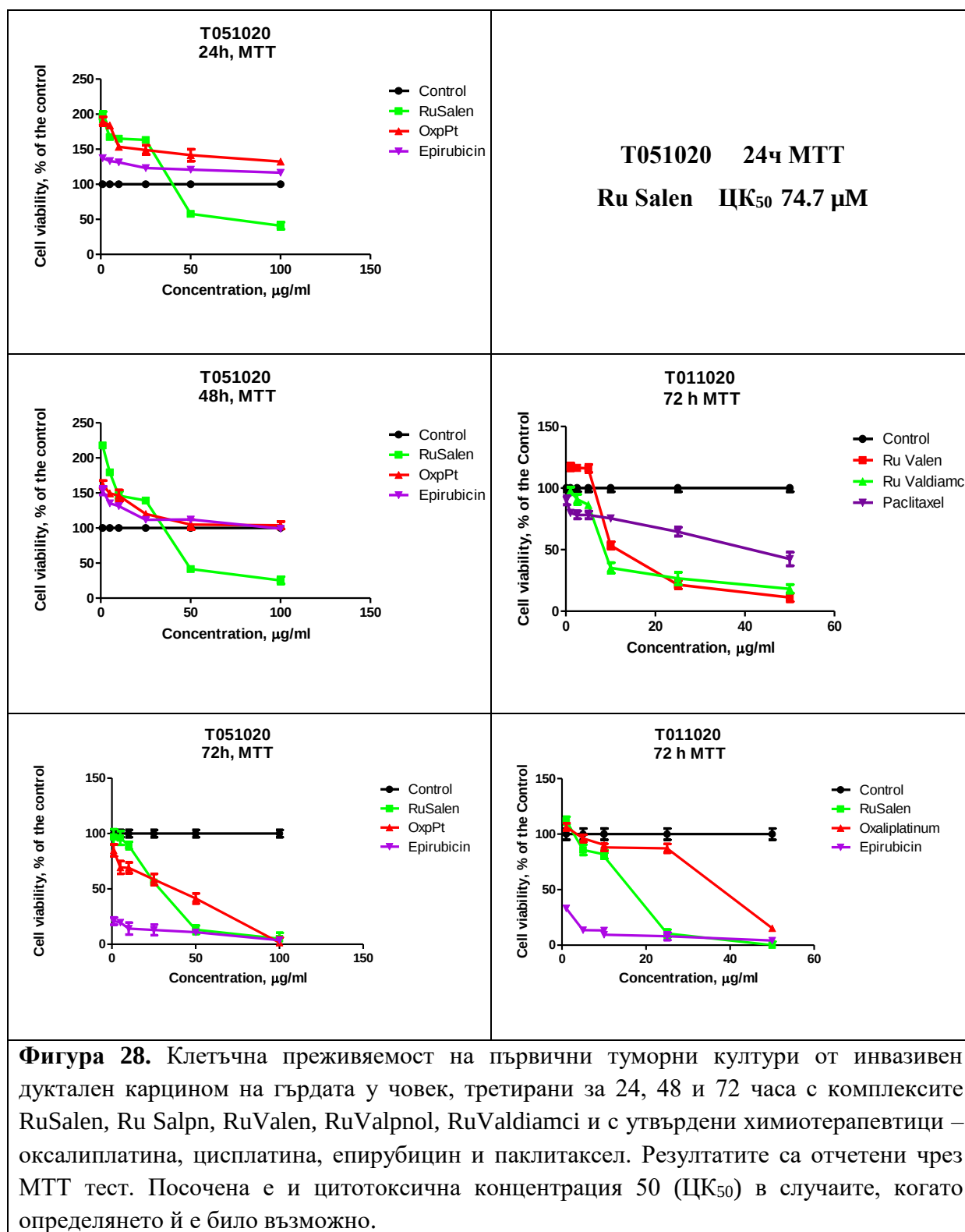
час. Този подход позволи получаването на ориентировъчни данни за чувствителността на изолираните първични туморни култури в рамките на 10 - 14 дни след получаване на туморната тъкан.

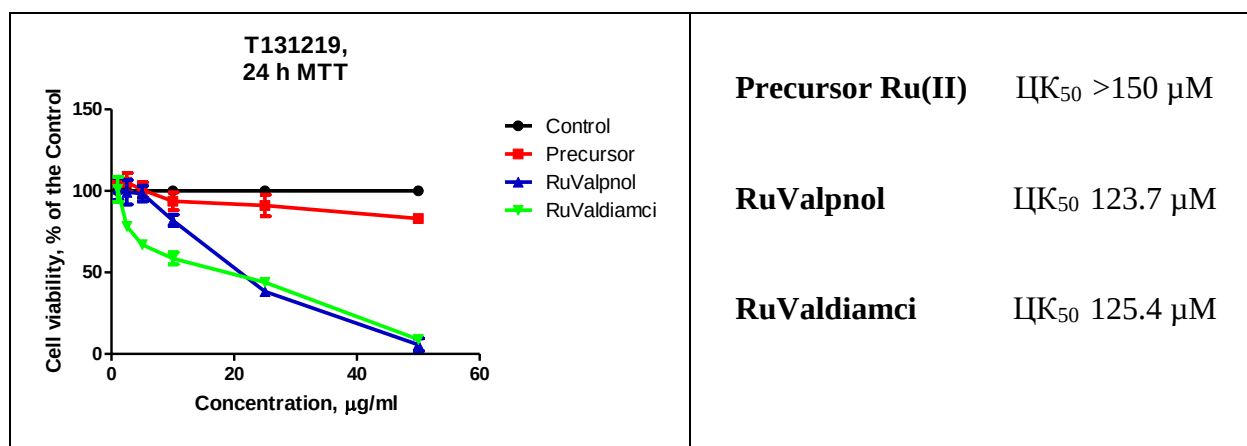
Клетките бяха размножавани и разделяни в допълнителни матраци, като след 3-4 пасажа бяха посяти върху 96-ямкови плаки с гъстота 1×10^5 /мл и бяха третирани с набор от утвърдени химиотерапевтици и част от изследваните новосинтезирани рутениеви комплекси. Наблюдавани бяха настъпващите цитопатологични промени (Фигура 27). Резултатите бяха отчетени след 24, 48 и 72 часово третиране чрез МТТ тест.

		
Контрола – нетретирани клетки	Ru Valpnol, 25 µg/ml 72 часа	Ru Valpnol, 50 µg/ml 72 часа
		
Контрола – нетретирани клетки	Ru Valdiamci, 25 µg/ml 72 часа	Ru Valdiamci, 50 µg/ml 72 часа

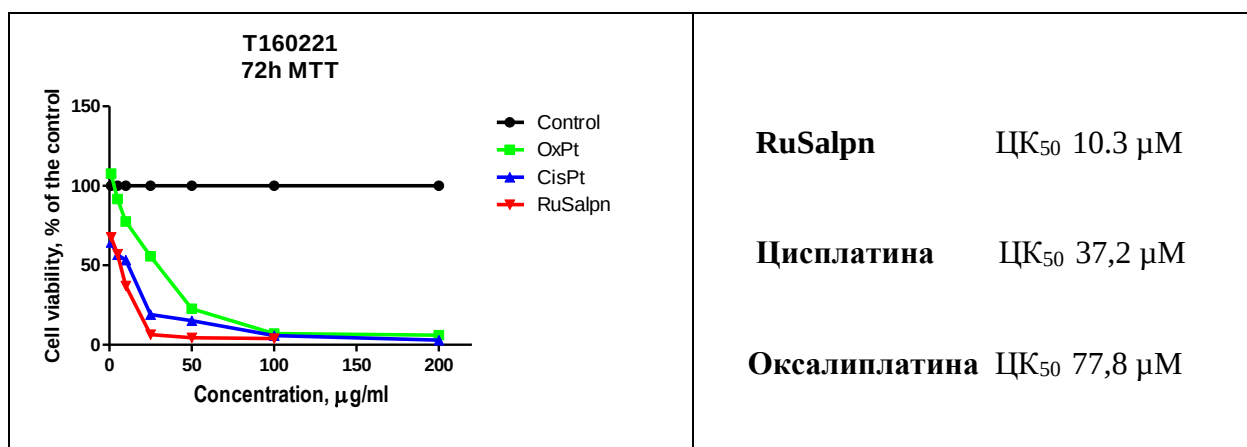
Фигура 27. Контролни (нетретирани) и третирани с Ru Valpnol и Ru Valdiamci клетки, изолирани от инвазивен дуктален карцином (първична култура №5), посяти и третирани след 2-ри пасаж (14-ти ден след изолирането). Инвертен микроскоп Carl Zeiss Jena, камера CAM 2800-XP 2.0, Увеличение 40х.

Бяха построени криви концентрация/отговор и бяха определени стойности на ЦК₅₀ и ЦК₉₀ (Фигури 28-30 и Таблица 10).





Фигура 29. Клетъчна преживяемост на първична туморна култура от инвазивен дуктален карцином на гърдата у човек след 24 часа въздействие с комплексите Ru Valpnol, RuValdiamci и техния прекурсор Ru(II). Резултатите са отчететни чрез MTT тест. Посочена е и цитотоксична концентрация 50 (IC_{50}) в случаите, когато определянето ѝ е било възможно.



Фигура 30. Клетъчна преживяемост на първична туморна култура, изолирана от миксоиден липосарком на бедрото след 72 часа третиране с оксалиплатина, цисплатина и комплекса Ru Salpn. Резултатите са отчетени чрез MTT тест. Посочена е и цитотоксична концентрация 50 (IC_{50}) в случаите, когато определянето ѝ е било възможно.

Таблица 10. Цитотоксична активност (ЦК₅₀ и ЦК₉₀, µg/ml и µM) на комплекси на Ru (II)/(III) с Шифови бази и утвърдени химиотерапевтици (оксалиплатина, цисплатина, епирубицин, паклитаксел) при първични туморни култури, изолирани от инвазивен дуктален карцином на гърдата у човек (А, Б) и миксоиден липосарком на бедрото (В).

А.

Първична култура ИДКГ (T011020)	ЦК ₅₀		ЦК ₉₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Ru Salen	36,0	37,5	50.4	52,6
Ru Valen	11.6	12,1	52.6	54,8
Ru Valdiamci	8.6	9,0	77.20	80,5
Oxaliplatin	75.8	90,8	103.9	108,3
Epirubicin	0.9	1,66	22.6	23,6
Paclitaxel	41.5	48,6	88.3	92,1

Б.

Първична култура ИДКГ (T051020)	ЦК ₅₀		ЦК ₉₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Ru Salen	28.4	29.6	68.7	71.6
Oxaliplatin	37.3	93.9	89.5	225.3
Epirubicin	<1.0	<1.8	57.3	105.4

В.

Първична култура Миксоиден липосарком	ЦК ₅₀		ЦК ₉₀	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
RuSalpn	7.0	10.3	23.1	34.0
Cisplatin	11.2	37.2	77.9	258.7
Oxaliplatin	30.9	77.8	91.0	229.0

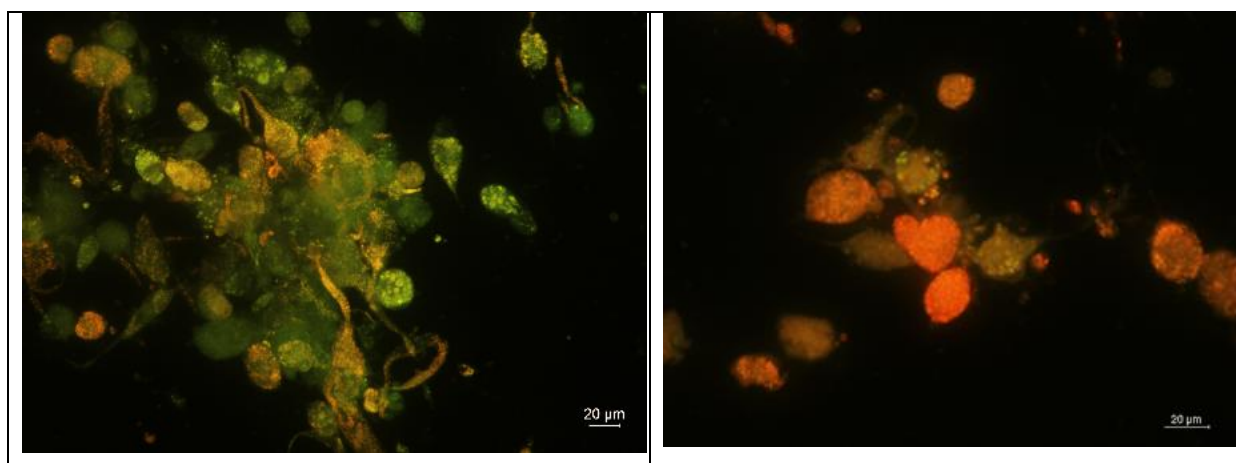
ЦК₅₀ и ЦК₉₀ – концентрации в µg/ml и µM, при които клетъчната преживяемост намалява съответно с 50% и 90% спрямо контролата от нетретирани клетки.

С получените данни за ЦК₅₀ (μM), получени с МТТ тест след 72 часа третиране, бяха построени йерархични редове, отразяващи чувствителността на постоянни клетъчни линии и първични култури от карцином на гърдата (Таблица 11).

Таблица 11. Йерархични редове, отразяващи чувствителността на постоянни клетъчни линии и първични култури от карцином на гърдата

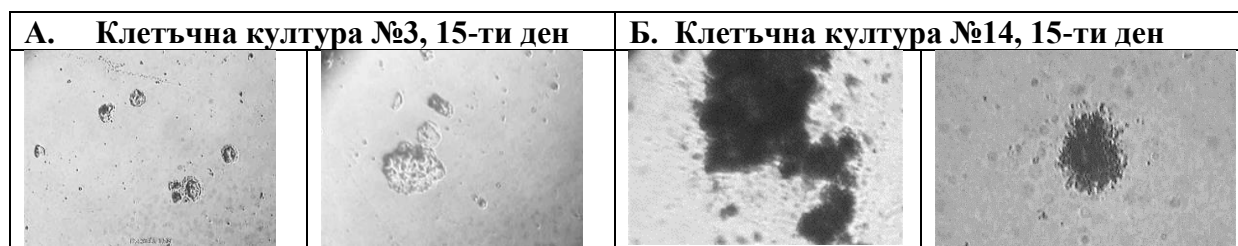
Клетъчна култура	Йерархичен ред МТТ, 72ч
Първична култура T131219	Epirubicin >RuValdiamci>RuValen>RuSalen> Paclitaxel > OxPt
Първична култура T051020	Epirubicin >RuSalen> OxPt
MCF7	RuValen>RuValdiamci> Epirubicin >RuSalen> CisPt > OxPt
MDA-MB-231	RuValdiamci> Epirubicin > OxPt >RuValen> CisPt >RuSalen
MCF10	OxPt >RuValen>RuValdiamci> CisPt >RuSalen> Epirub

Бяха подготвени препарати за флуоресцентна микроскопия, оцветени с акридин оранж и пропидиев йодид, които дадоха възможност да се прецени виталността на клетъчните култури и послужиха като ориентир за наличието на апоптотични промени (Фигура 31).



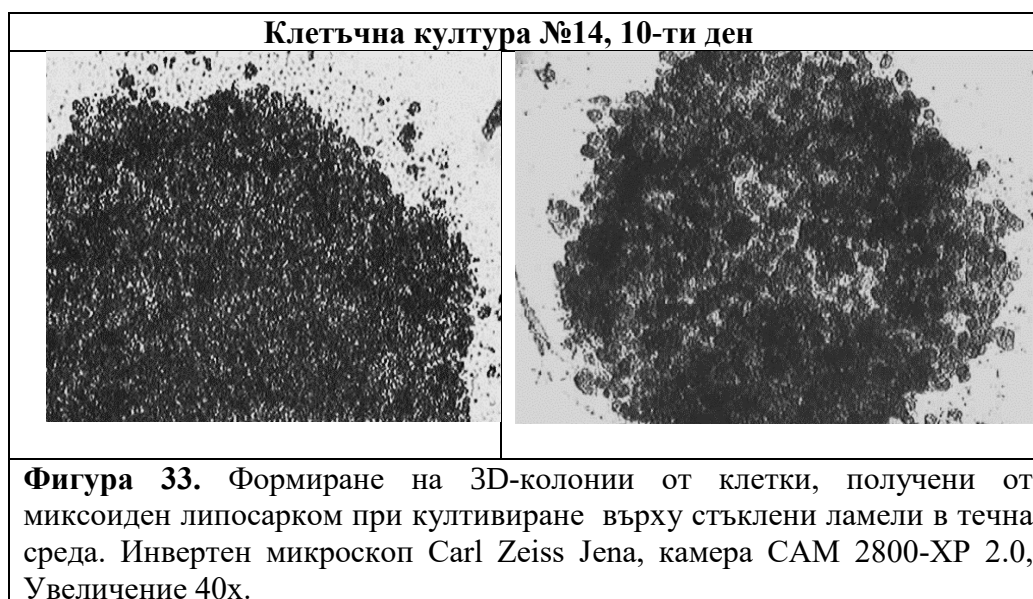
Фигура 31. Първични туморни култури от инвазивен дуктален карцином на гърдата при човек, А – Нетретиран, Б – третиран за 72 часа с 10 μg/ml RuValen. Оцветяване с АО/PI, Флуоресцентна микроскопия, Leica DM5000B, 200х.

Като *in-vitro* тест за туморогенност беше изследвана способността на клетките от първичните култури от тумори да образуват триизмерни (3D) колонии в полутечна среда. Формиране на колонии с повече от 10 клетки беше регистрирано след 10-15 дни (Фигура 32).



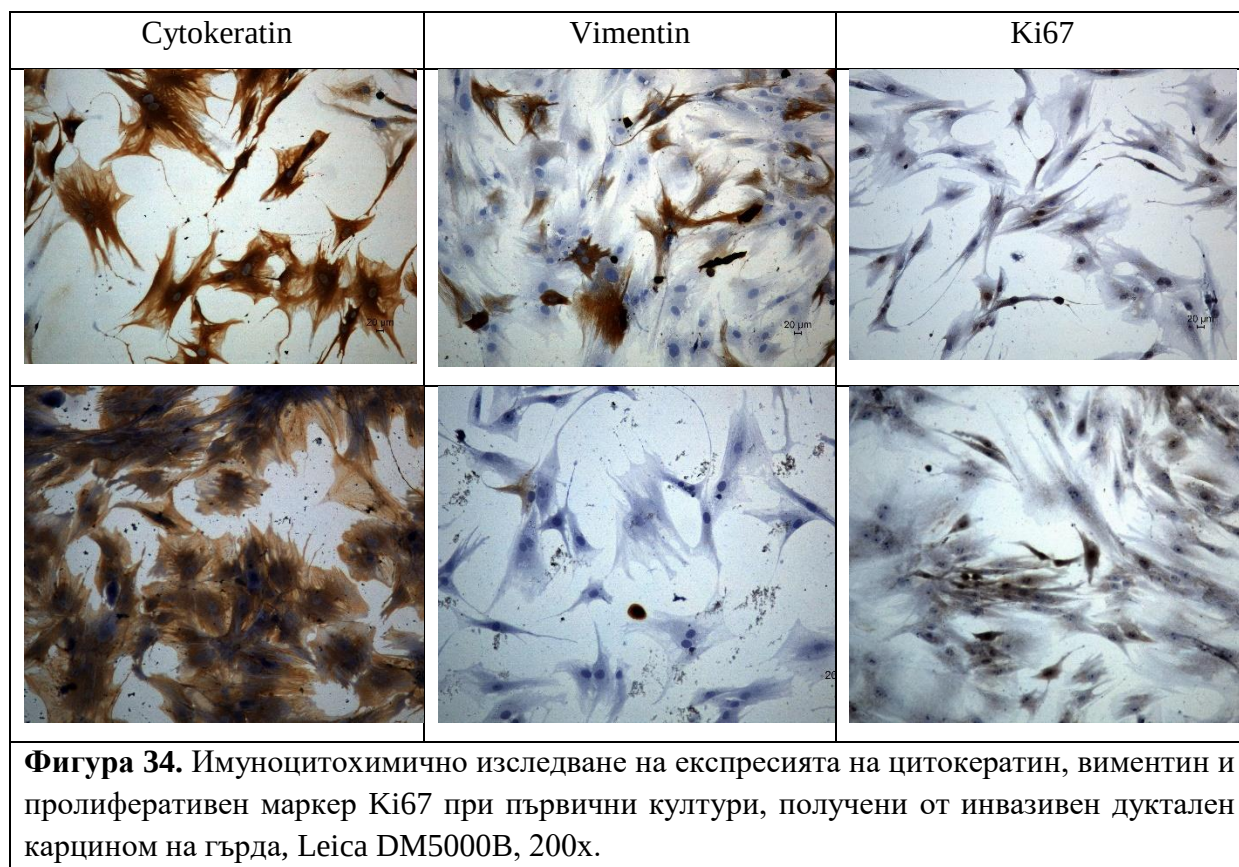
Фигура 32. 3D-колонии-образуваща способност на първични клетъчни култури, получени от инвазивен карцином на гърдата (А) и миксоиден липосарком (Б). Инвертен микроскоп Carl Zeiss Jena, камера CAM 2800-XP 2.0, Увеличение 40х.

Клетките, получени от миксоиден липосарком проявиха склонност към формиране на 3D-колонии също и при култивиране върху стъклени ламели и дъното на 6-ямкови плаки в течна хранителна среда (Фигура 33).



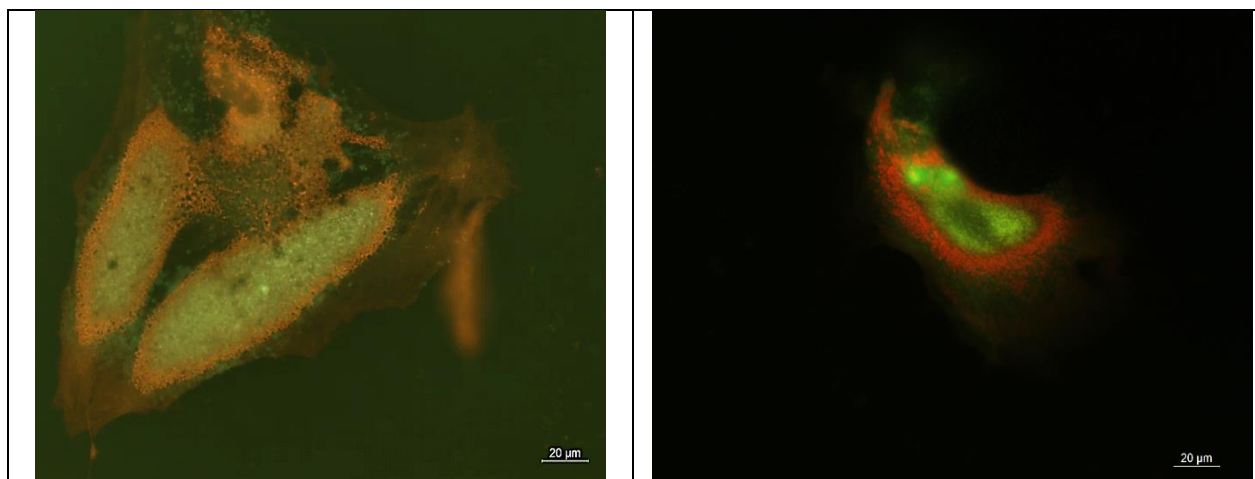
При първия пасаж клетките бяха имунофенотипизирани с панел антитела за клетъчна диференциация, пролиферативна активност, наличие на рецептори за естроген, прогестерон и епидермален растежен фактор 2. Въпреки хистологичното сходство (произход от инвазивен дуктален карцином на гърда), отделните култури показаха индивидуално специфични нива на експресия на изследваните маркери (Фигура 34). Наблюдавани бяха единични клетки, неотличаващи се морфологично, експресиращи

мезенхимния маркер виментин, характерен за туморните стволови клетки при карцином на гърдата.



Първичните клетъчни култури бяха пролиферативно активни в продължение на около 6 месеца и претърпяха до 28 пасажа, след което култивирането обичайно беше прекратявано.

При някои от тях култивирането беше продължено и след като клетките забавиха значително пролиферацията си и след пасаж се адхезираха като единични клетки без да формират монослой. Единични витални клетки бяха идентифицирани след култивиране в продължение на 300 дни чрез оцветяване с АО/РІ и флуоресцентно микроскопиране (Фигура 35).



Фигура 35. Клетки от първична култура, изолирана от инвазивен дуктален карцином на гърдата при човек след култивиране в продължение на 300 дни. Оцветяване с АО/PI, Флуоресцентна микроскопия, Leica DM5000B, 400x

Наблюдаваните клетки са с неправилна форма и размери между 120 и 200 μm , ядрено-цитопламеният индекс е изместен в полза на ядрото (Фигура 35). Трябва да се отбележи както запазената способност за делене, така и високата синтетична активност на тези клетки, визуализирана чрез обилие от цитоплазмени гранули, индуциращи оранжев флуоресцентен сигнал, което обичайно е характерно за рибозомални РНК молекули.

Именно особеностите на тези продължително физиологично активни клетки насочиха понатъшната теоретична и експериментална работа към проучване на характеристиките на туморните стволови клетки, чиито резултати са посочени в раздел **Детекция на клетъчни популации с фенотип на туморни стволови клетки.**

5. ОБСЪЖДАНЕ

Доскоро всички пациенти с един и същ вид и стадий на онкологично заболяване получаваха унифицирано лечение. Клиничната практика показва, че диагностично еднакви тумори реагират по различен начин на една и съща терапия. Освен това всеки тумор претърпява генетични промени, които предизвикват растеж и метастазиране. Промените, които настъпват при туморите на отделните пациенти, са строго индивидуални и тези разлики водят до различен отговор на лечението. Преходът от стандартна концепция, определяща избора на лечение, към задълбочен молекулярен анализ, който води до индивидуализиран подход, е един от най-важните успехи на съвременната онкология. Променената перспектива, насочваща вниманието към специфичните молекулярни изменения на тумора, отваря път към персонализирано лечение. Клетъчният състав на туморите е основен фактор, определящ както биологичните, така и клиничните характеристики на заболяването на даден индивид. Голямото вътретуморно клетъчно разнообразие гарантира поне една субпопулация туморни клетки, която е в състояние да понесе променените условия по време на лечението или при преместването им на метастатично място [70, 71]. Тук особена роля заема субпопулацията от туморни стволови клетки (ТСК), която включва 0.1 – 1% от клетъчния състав на тумора. Тези клетки запазват способността си за самообновяване и са в състояние да се диференцират в хетерогенни линии, изграждащи тумора и притежават ендогенни механизми за резистентност срещу лъче- и химиотерапия в много по-висока степен, отколкото не-стволовите диференцирани туморни клетки.

Лекарствената резистентност представлява постоянно предизвикателство при лечението на малигнените неоплазми и несъмнено е основна причина при негов неуспех. Тя е и водещата причина за продължаващото активно търсене на нови съединения с антитуморни свойства. Специален интерес представляват металните комплекси. Откриването на антитуморния ефект на платината поставя началото на ерата на химиотерапевтиците на метална основа. Медикаменти на основата на платина (цисплатина, оксалиплатина и карбоплатина) се използват рутинно самостоятелно или в комбинация с други препарати за лечение на различни злокачествени заболявания (карциноми на пикочен мехур, тестиси, гърда, бял дроб, яйчници, колоректален карцином, карциноми на главата и шията както и някои саркоми). Те обаче имат някои ограничения, включително слаба селективност, изразена нефротоксичност и нарастваща химиорезистентност [205,206].

Редица неплатинови металофармацевтици, съединения на основата на рутений (III), злато (I), галий(III), мед(II), кобалт(II) и никел(II) са изследвани за антитуморен потенциал [207, 208, 209]. В търсене на алтернативни противоракови средства на метална основа сред най-обещаващи кандидати се оказват съединенията на рутений [210, 211].

При изпълнението на задачите, поставени в представения Дисертационен труд, бяха изследвани потенциалните цитотоксични и антипролиферативни свойства на 8 новосинтезирани комплекси на Ru(III) с Шифовите бази Salen, Salphen, Salpn, Valen, Valphen, Valpn, Valpnol и Valdiami и техния прекурсор с Ru(II) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия човешки и животински туморни и нетуморни клетки.

5.1. Избор на вещества

Съединенията на рутения притежават редица предимства пред платиновите комплекси, сред които ефикасност, съчетана с по-ниска токсичност, по-слабо изразена способност да предизвикват устойчивост в туморните клетки, липса на кръстосана резистентност с платиновите препарати. Рутеният се счита за алтернатива на химиотерапевтиците на основата на платина. Много негови съединения са по-малко токсични от тях, а някои са доста селективни за туморните клетки [224]. Тези свойства може да се дължат на способността на Ru да имитира желязо при свързването с биомолекули [225]. Свърхекспресиранияте рецептори за трансферин на малигнените клетки поради повишената им нужда от желязо могат ефективно да доставят комплекси на Ru във вътрешността на клетките [226].

Публикувани са редица изследователски съобщения за изразена антинеопластична активност на различни съединения на рутения. Първото съединение на рутений, използвано в клиничната практика, е NAMI-A. Доказано е, че е ефективно при лечение на метастази от рак на белия дроб. В момента NAMI-A се използва заедно с гемцитабин като втора линия химиотерапия за терапия на метастази при недребноклетъчен карцином на белия дроб [227]. Други съединения, използвани в клиничната практика, са KP1019 и разтворимият му вариант KP1339, който е преминал фаза I на клинично проучване при невроендокринни тумори [228].

От друга страна, биологичните особености на Шифовите бази и техните метални комплекси включват обещаващи антивирусни, антимикробни и антитуморни свойства. Специалистите са обнадеждени, че тези съединения ще подпомогнат преодоляването на лекарствена устойчивост на малигнените клетки – един от основните проблеми,

възпрепятстващи успешното лечение на онкологичните заболявания. Едно от най-големите им предимства в това отношение е способността да взаимодействат едновременно с няколко молекули-мишени в клетката. Това би довело до увеличаване на терапевтичния им ефект и би намалило риска от възникване и селектиране на устойчиви към действието им клетки. Редица съобщения в литературата потвърждават, че металните комплекси на шифовите бази са по-ефективни в сравнение със самостоятелно приложените лиганди. При наши предишни проучвания беше установено, че комплекси на Zn/Ag и Zn/Au с шифовите бази Salen, Salampy, Saldmen и производни на Dield, както и комплекси на Cu(II) с шифови бази, получени при кондензационна реакция между o-vanillin и DL-tryptophan, L-serine, L-threonine, S-tyrosine, значително намаляват преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия птици, плъши и човешки ракови клетки, включително такива, характеризиращи се с множествена лекарствена устойчивост (Абудалех, 2014; Живкова, 2018; Динев, 2020).

Включването на утвърдени химиотерапевтици (цисплатина, оксалиплатина, епирубицин, паклитаксел) като база за сравнение в нашите експерименти беше направено поради следните причини:

1. Изследваните от нас новосинтезирани съединения на руетений с шифови бази са метални комплекси, а платината е единственият метал навлязъл в онкологичната практика и неговите съединения (цисплатина и оксалиплатина) са едни от най-често използваните медикаменти при лечение на онкологични заболявания (карцином на пикочния мехур, цервикален карцином и др);
2. Епирубицинът и платиновите препарати имат различен механизъм на действие. Той е антрациклинов противотуморен антибиотик, а цисплатината и оксалиплатината са алкилиращи агенти. Епирубицинът е част от комбинирани терапевтични схеми при карцином на гърдата, малигнени лимфоми, карциноми на стомаха, черния дроб, панкреаса и др.

5.2. Избор на експериментални модели

Като моделни системи в проведените *in vitro* експерименти бяха използвани 6 туморни клетъчни линии (5 човешки и 1 плъша) с различен хистологичен произход (карциноми и саркоми) и 2 нетуморни човешки постоянни клетъчни линии (Таблица 2). Подборът беше направен въз основа на специфичните им особености, даващи възможност за

разнопосочни оценки на предизвиканите от изследваните новосинтезирани комплекси на рутений цитотоксични ефекти :

- Клетъчната линия LSR-SF-SR е получена от трансплантируем сарком у плъх, предизвикан с птичия *Rous sarcoma virus* щам *Schmidt-Ruppin* (SR-RSV). Клетъчните аналози на съдържащия се в този вирус и в трансформираните с него клетки онкоген *v-src* са с доказано участие в патогенезата на редица злокачествени заболявания у животните и са разпознати като потенциални мишени за прицелна антитуморна терапия;
- Линията HeLa е получена от карцином на шийката на матката. Известно е, че по броя на причинените смъртни случаи това заболяване се нарежда на трето място сред останалите неоплазии при жените;
- HT29 е клетъчна линия от колоректален аденокарцином при човек. Карциномът на дебелото черво е водеща причина за заболяемост и смъртност от онкологични заболявания в много страни;
- Saos-2 е клетъчна линия, изолирана от остеосарком с твърде широка лекарствена резистентност. Остеосаркомите засягат млади пациенти, имат агресивно клинично развитие и няма утвърдена терапевтична схема за лечението им;
- Клетъчните линии от карцином на гърдата при човек (MCF-7 и MDA-MB-231) са с различни профили на експресия на маркерите, характеризиращи биологичното поведение на мамарните карциноми (Таблица 3). Тройнонегативният карцином на гърдата (чийто модел пресъздава клетъчна линия MDA-MB-231) все още е с крайно ограничени възможности за лечение;
- Нетуморната клетъчна линия от млечна жлеза (MCF10) ни даде възможност да получим информация за въздействието на изследваните от нас вещества върху нетуморни тъкани;
- Човешките ембрионални фибробластоидни клетки от линии Lер-3 също бяха използвани за сравнителни изследвания;
- Първичните туморни култури представляват много привлекателен *ex vivo* модел за прогнозиране на лекарствения отговор и информирано вземане на клинични решения за подобряване на терапевтичните резултати. Основното им предимство е възможността за динамична оценка на еволюцията на тумора и клоналната селекция вследствие на излагане на противотуморна

терапия. Възможността да се тества директно върху тумора на конкретен пациент представлява голяма стъпка към персонализиран подход в медицинската онкология.

5.3. Цитотоксични и антипролиферативни свойства на изследваните комплекси на рутений с шифови бази

Получените от нас резултати показаха, че приложени в определени концентрационни граници (1 – 100 $\mu\text{g/ml}$, за клетъчна линия Saos-2 до 400 $\mu\text{g/ml}$) за 3-72 часа, изследваните комплекси намаляват в различна степен преживяемостта и пролиферативната активност на използваните като експериментални модели туморни клетки, предизвиквайки в тях характерни цитопатологични изменения. Като цяло, ефектът на веществата нараства с увеличаване на концентрацията и времето на въздействие. Трябва да се отбележи обаче, че силно изразеният на 24-ия час цитотоксичен ефект почти не търпи по-нататъшно развитие (в сравнение с 48 и 72 час, Фигури 21-22, 35-36, 41-42, 46-47 и 51-52 от Дисертационния труд).

Цитотоксичният/антипролиферативният ефект на веществата беше доказан с помощта на комплексен подход, включващ изпълнение на краткосрочни (3-72 часа, с монослойни култури) и дългосрочни (до 43 дни, с 3D колонии от туморни клетки) експерименти и методи с различни клетъчни/молекулни мишени и механизми на действие.

Получените резултати показват, че комплексите на Ru(III) с Шифови бази в по-висока степен намаляват преживяемостта и потискат 2D и 3D растежа на третираните клетки в сравнение с техния предшественик – комплексът на Ru(II)

С най-добре изразена способност да намаляват преживяемостта и пролиферацията на туморните клетки се отличават комплексите Ru Salpn и Ru Valdiamci, чиято ефективност превъзхожда или е сравнима с тази на утвърдените в клиничната онкологична практика препарати цисплатина, оксалиплатина, епирубицин и паклитаксел.

5.4. Съпоставимост на резултати, получени чрез различни изследователски методи

5.4.1. Клетъчна преживяемост, установена чрез различни цитотоксични тестове

При използвани като моделни системи клетъчни линии беше наблюдавана много добра съпоставимост между резултатите, получени при проведените при стандартизирани условия цитотоксични методи – МТТ тест (MTT), метод за включване на неутрално червено (NR) и оцветяване с кристал виолет (CV) (Фигури 24-25, 31-32, 37-38, 43-44, 48-49

и 53-54 от Дисертационния труд). Приложихме три различни метода за определяне на клетъчна преживяемост, тъй като MTT, NR и CV имат различни мишени и механизми на действие. MTT тестът се основава на способността на митохондриите (на съдържащия се в тях ензим сукцинат дехидрогеназа) да редуцират тиазол блу тетразолиум бромид до неразтворим виолетово оцветен формаза. Методът е приет за златен стандарт при определяне на токсичното въздействие върху клетки в култура. Тестът за поглъщане на неутрално червено се основава на способността на жизнеспособните клетки да поемат суправитално багрилото неутрално червено, то прониква в киселите органели на клетката и е показател за целостта на лизозомите, а вероятно и на апарата на Голджи. При физиологично рН нетният заряд на багрилото е нула. Този заряд му позволява да навлезе през клетъчните мембрани. Във вътрешността на лизозомите има протонен градиент, който поддържа рН по-ниско от това на цитоплазмата. По този начин багрилото се зарежда и се задържа във вътрешността на лизозомите. Когато клетката загине или рН градиентът намалее, багрилото не може да се задържи. Кристал виолетът оцветява ядрата на клетките, но също така отчита отпадането на адхезионните способности на клетките.

Влиянието на изпитваните комплекси на рутений (II)/(III) с шифови бази върху пролиферативната активност на третираните клетки беше изследвано чрез имуноцитохимично определяне на експресията на маркера за пролиферативна активност Ki67. С негова помощ може да се оцени пулът от пролифериращи клетки, върху които въздействат химиотерапевтичните препарати. Положителната имуноцитохимична реакция за Ki67 показва, че клетката се намира в интервала от късна G1-фаза до M-фаза включително. По време на интерфазата Ki67 влиза в състава на хетерохроматина в областта на ядрцата. Започвайки от късна G1-фаза, участва във формирането на малки гранули в ядрото, а през G2 и S-фазите образува големи фокуси хетерохроматин с ядрцата. През M-фазата локализацията на Ki67 коренно се променя и той преминава на повърхността на кондензираните хромозоми. При изследваните туморни клетъчни линии (MDA-MB-231, MCF-7, Saos-2, HeLa) имуноцитохимичната реакция показва запазена експресия на Ki67 след третиране с комплекси на Ru(III) с шифови бази (Фигури 8 и 9). Негативна реакция беше установена при по-малко от 5% от третираните туморни клетки. Изместена в нехарактерна локализация (цитоплазма) експресия на Ki67 беше наблюдавана при клетки от линия HeLa след третиране с комплексите RuSalen и RuSalpn (Фигура 10).

Получените експериментални данни подсказват, че изпитваните от нас комплекси на Ru(III) биха били подходящи за комбинирано приложение с т.нар. фазово-специфични

антитуморни агенти, които проявяват цитотоксичния си ефект по време на определени фази на клетъчния цикъл. Сред тях са антиметаболитите, които са по-активни по време на S-фазата на клетъчния цикъл, а винка алкалоидите, епиподофилотоксините и таксаните – в М фазата.

5.4.2. Определяне на типа предизвикана клетъчна смърт

Типът клетъчна смърт, предизвикана при третиране с изследваните комплекси на Ru(II)/(III) беше установен чрез двойно флуорохромиране с акридин оранж и пропидиев йодид, имуцитохимично с поликлонално антитяло Annexin V и визуализация с хромогена диаминобензидин (DAB), както и с помощта на Annexin/FITC метод. Беше установена способността на рутениевите комплекси да предизвикват цитопатологични изменения и апоптотичен тип смърт в третираните с тях клетки. При начален стадий на апоптоза ядрото е ярко зелено с кондензация на хроматин под формата на плътни зелени области и формиране на характерни апоптотични изпъквания по клетъчната повърхност („apoptotic blebs“). В напреднал стадий на апоптоза ядрото е оранжево-червено с кондензация на хроматина, а в късните етапи на апоптотична смърт клетките са тъмночервено оцветени поради навлизането на пропидиев йодид през компроментираните клетъчни мембрани на мъртвите клетки.

Типичната за ранна апоптоза мембранна локализация на реакцията с FITC-конюгирания Annexin V беше наблюдавана при третиране с комплексите RuSalpn, RuSalphen и RuSalen клетки от линии HeLa и LSR-SF-SR.

Чрез имуноцитохимична реакция с Annexin V беше проследено изместването на локализацията му от цитоплазмата към клетъчната мембрана при третиране с изследваните от нас комплекси на рутений с шифови бази и така беше установен времевият интервал за стартиране на ранна апоптоза – между 3-ия и 6-ия час след началото на третирането. Много добре изразена мембранна реакция беше установена на 6-ия час от третиране на остеосаркомни клетки от линия Saos-2 с комплекса RuValphen (10-50 µg/ml) и на 3-ия час при RuValpn (5 µg/ml), Фигура 15. Бързото цитотоксично действие на веществата заслужава внимание, тъй като ограничава възможностите на туморите за прогресия и метастазирание както и за възникване и селектиране на устойчиви на терапия клетъчни клонове. Със способността си да предизвикват смърт чрез апоптоза, изследваните от нас комплекси на рутений отговарят на едно от най-важните изисквания към потенциалните антитуморни агенти – да стимулират

физиологичен тип клетъчна смърт, който да не обременява организма с възпалителна реакция.

Способността на изследваните от нас комплекси на Ru(II)/(III) да предизвикват автофагия беше проучена чрез трансмисионно електронна микроскопия (ТЕМ), чрез имуноцитохимична детекция на белтъка LC3В с моноклонално антитяло и визуализация с DAB хромоген за светлинна микроскопия и чрез флуоресцентна конфокална микроскопия при реакция с монодансилкадаверин. Беше установено, че концентрациите, при които след 24-часово третиране се регистрира формиране на автофагозоми, са близки до ЦК₅₀ и дори до ЦК₉₀ при 72-часово третиране. Въз основа на това можем да направим обосновано предположение, че стартиралата в началото на третирането (3-6-24 час) автофагия завършва с клетъчна смърт. Известно е, че автофагията изпълнява двойствена роля в хода на канцерогенезата и може да подпомогне оцеляването на туморните клетки или да доведе до гибелта им. Получените от нас резултати показват, че под въздействие на изпитваните комплекси на рутений се осъществява вторият сценарий.

Проведеното от нас проучване за пореден път показва, че при определянето на потенциалната цитотоксична/цитостатична и антитуморна активност на веществата трябва да се използва комплексен подход, включващ методи, регистриращи промените в различни клетъчни молекули и органели, основаващи се на различни принципи, оценяващи различни страни от биологичното поведение на веществата и предоставящи взаимно допълваща се информация. Подобни проучвания биха позволили получаването на по-цялостна представа за цитотоксичната активност на изследваното вещество и биха подпомогнали изясняването на неговите мишени в клетката, както и предполагаемия механизъм на действие

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

Бързият цитотоксичен ефект на рутениевите комплекси се запази и при дългосрочните (до 43 дни) експерименти. Получените резултати показаха, че комплексът RuSalpn, приложен в концентрация 5 µg/ml напълно потиска 3D колонии - образуващата способност на туморните клетки от линии Saos-2, HeLa и LSR-SF(SR), като само неговата колонии-инхибираща концентрация (КИК) е ≥ 5 µg/ml (Таблица 6). При прекурсора такова потискане се наблюдава при концентрации ≥ 100 µg/ml (≥ 200 µg/ml при клетъчна линия HT29), а за останалите комплекси КИК са в диапазона 10-50 µg/ml.

При предишни наши проучвания (Живкова, 2018) беше установено, че самостоятелно приложеният лиганд Salen не потиска 3D растежа на клетките от линия LSR-SF-SR.

При дългосрочни тестове за 3D-колонии-образуваща способност на клетки от карцином на гърдата учовек (клетъчни линии MCF7 и MDA-MB-231) бяха установени ниски стойности на Колонии-инхибиращата концентрация (КИК) от $\geq 5.0 \mu\text{g/ml}$ за комплексите RuSalpn, RuValen, RuValpn и RuValpnol за клетъчна линия MDA-MB-231 и за RuValpnol при клетъчна линия MCF7 (Таблица 7).

Тези резултати несъмнено представляват интерес, тъй като подсказват устойчив във времето (ефектът на веществата беше проследен в продължение на > 40 дена) антитуморен ефект на изследваните новосинтезирани комплекси на рутений с шифови бази.

5.5. Определяне влиянието на комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази върху миграционната способност на туморни клетки

Миграционният капацитет на туморните клетки играе важна роля в редица процеси от развитието на туморите, включително неоангиогенеза и метастазиране. Инхибиращият ефект на изследваните рутениеви комплекси с шифови бази върху способността за миграция и инвазия на туморни клетки от постоянни линии беше изследван чрез метод, основан на заздравяването на рани (wound healing) след скарификация на клетъчния монослой. Тестът за заздравяване на рани може да провери поведението на клетките при миграция, като по този начин показва възможността за метастазиране на злокачествените неоплазми.

Третирането с комплексите RuValen ($10 \mu\text{g/ml}$) и RuValphen ($25 \mu\text{g/ml}$) потиска миграционния капацитет на клетките от линия MDA-MB-231 (тройно негативен карцином на гърдата); RuValpn в концентрация $100 \mu\text{g/ml}$ е ефективен при клетъчни линии MCF7 (карцином на гърдата луминален тип A) и HT29 (колоректален карцином); Комплексите RuValphen и RuValpn в концентрация $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ и RuValpnol и RuValdiamci ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) напълно инхибират миграционния капацитет на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR. Получените от нас резултати за потискане на миграционната способност на туморни клетки под действие на комплекси на Ru(II)/(III) с шифови предполагат добър антиметастатичен ефект. Както беше цитирано, първото съединение на рутений, използвано в клиничната практика, е NAMI-A, за което е

доказано е, че е ефективно при лечението на метастази от рак на белия дроб. В момента NAMI-A се използва заедно с гемцитабин като втора линия химиотерапия при лечението на метастази при недребноклетъчен карцином на белия дроб. Тук е мястото да припомним, че клетъчната линия MCF-7 е получена от метастатичен карцином (плеврален излив) на млечната жлеза при човек.

5.6. Клетъчно-специфичен отговор

При проведените експерименти беше наблюдаван клетъчно специфичен отговор, който се изрази в различната степен на повлияване на отделните клетъчни линии в присъствие на тестираните вещества. Комплексът RuSalpn проявява най-силно изразен цитотоксичен ефект при клетките от линия MDA-MB-231 и HT29 и най-слаб при Saos-2, докато Ru Valdiamci показва най-висока ефективност при MDA-MB-231 и Saos-2 и най-ниска при нетуморните клетъчни линии Lep3 и MCF10.

Хетерогенността на туморните клетки и предизвиканият от нея клетъчно-специфичен отговор, е основна причина при провеждането на проучвания за определяне на биологична активност на вещества да се използват като моделни системи набор от клетъчни култури, както и различни изследователски методи и техники. В това отношение особено ценни данни получихме при експериментите с изолираните от нас първични туморни култури от карциноми на гърдата и саркоми на бедрото. Тяхната избирателна чувствителност (Таблица 11) към тестваните от нас вещества се различаваше значително от получените резултати при постоянни клетъчни линии с подобен хистологичен произход (MDA-MB-231 и MCF7). Първичните култури пресъздават много по-точно биологията и поведението на туморите *in vivo* в сравнение с претърпелите огромен брой пасажи в лабораторни условия постоянни клетъчни линии.

5.7. Сравняване чувствителността на туморни и нетуморни клетки с еднакъв произход към цитотоксичното действие на изпитваните вещества.

Едно от основните изисквания към антитуморните препарати е действието им да е насочено главно към малигнено трансформираните, а не към нормалните клетки на организма. Ето защо в нашите експерименти бяха включени 2 нетуморни линии от човешки клетки – MCF10, изолирана от нормален паренхим на млечна жлеза и Lep3, получена от ембрионални белодробни фибробласти.

Установихме, че комплексите RuValdiamci, Ru Salpn, Ru Salen, Ru Salphen оказват селективен ефект спрямо туморните в сравнение с нетуморните клетъчни линии (Таблица

4). Прави впечатление, че нетуморните клетки от линия Lep-3 проявяват висока устойчивост към цитотоксичното въздействие на прекурсора на рутениевите комплекси, както и към комплексите RuSalen и RuSalphen (Фигура 19 и Таблица 12 от Дисертационния труд). Макар да нямат туморен произход и поведение, клетките от линията Lep-3 (получена от ембрионални клетки) притежават доста от характеристиките на злокачествено трансформирани клетки, като висока пролиферативна активност; по-ниска степен на диференциация в сравнение с нормалните клетки на зрелите организми и експресия на ембрионални антигени.

Включването на цитотоксични агенти в подходящи системи за насочена доставка на биологичноактивни вещества (например липозоми или други наночастици) би позволило селективното им достигане до туморните клетки и значително понижаване на нежеланите странични ефекти.

5.8. Връзка между състава/структурата на веществата и тяхната биологична активност

Установяването на зависимост между състава/структурата и биологичната активност на съединенията изисква провеждането на задълбочен целенасочен анализ, който не е бил обект на представения Дисертационен труд. Във всички случаи обаче трябва да се отбележи, че: а) прекурсорът съдържащ Ru(II) не оказва значително цитотоксично действие върху третираните клетки; б) сред изследваните от нас вещества комплексите RuSalpn и RuValdiamci се отличават с най-висока цитотоксична/цитостатична способност; в) RuSalen понижава в значително по-слаба степен преживяемостта / пролиферативната активност на третираните клетки в сравнение с комплексите на Zn(II)/Ag(I) и Zn(II)/Au(I) със същия лиганд. Самостоятелно приложен, лигандът Salen не проявява значителна цитотоксична активност (Живкова, 2018).

5.9. Механизъм на действие

Безспорно един от най-важните въпроси при изследването на антитуморна активност е изясняването на механизма на действие на веществата, както и уточняването на клетъчните им мишени. Отговорът на тези въпроси обаче изисква провеждането на разнообразни, скъпоструващи експерименти, и не беше предмет на представения Дисертационен труд. Наличните в литературата данни и получените от нас първоначални резултати дават възможност за формулиране на някои предположения и най-вече за определяне насоката на бъдещите ни изследвания.

Известни са различни механизми, отговорни за антинеопластичните свойства на веществата: влияние върху микротубулите; потискане дейността на топоизомеразите;

алкилиране на ДНК; понижаване синтеза на ДНК; потискане на белтъчния синтез; инхибиране активността на липооксигеназата; влияние върху имунната система и др.

Първите изследвани за антитуморна активност рутениеви комплекси са хлоро-амино-Ru(III) съединения и два хлоро-диметилсулфоксид Ru(II) изомера (Clarke, 1980; Mestroni et al., 1989, 1993). По-късно е установено, че някои комплекси на Ru(III) с индазолови и имидазолови лиганди проявяват изразен антинеопластичен ефект при различни експериментални туморни модели (белодробен карцином на Lewis, карцином на млечната жлеза MCa, меланом B16 и др.) и с тях са проведени задълбочени предклинични изпитания. Особено перспективни сред тях са се оказали индазоловите комплекси, които са по-ефективни и са слабо токсични (Trynda-Lemiesz et al., 1999, Alessio et al., 1999). Внимани заслужават и някои имидазолови съединения, какъвто е (Im H) [trans – RuCl₄(Me₂SO)(Im)], наречен накратко NAMI-A. За разлика от цисплатината, която е активна по отношение на първичния тумор, NAMI-A повлиява предимно спонтанно възникналите метастази. Нещо повече, избирателният потискащ ефект на NAMI-A спрямо белодробните метастази е силно изразен, дори когато процесът е доста напреднал. Това води до значително увеличаване на преживяемостта при лабораторни животни, особено когато прилагането на веществото се съчетае с хирургично отстраняване на първичния тумор (Sava et al., 1999). Установено е, че механизмът на действие на NAMI-A се различава от този на цисплатината и се свързва със способността на рутениевия комплекс да: потиска клетъчната пролиферация най-вероятно в резултат на временно спиране на клетъчния цикъл във фаза G2M; да променя морфологията на клетъчните мембрани; да инхибира експресията на CD44 и намалява инвазионната способност на туморните клетки; да оказва антиангиогенно действие при различни експериментални модели *in vitro* и *in vivo*. NAMI-A е първият рутениев комплекс, който е преминал клинични изследвания. През последните години са създадени нови класове рутениеви комплекси, производни на NAMI-A, като: 1) Комплекси, в които е променен N-лигандът на NAMI-A; 2) Бинуклеарни съединения, съдържащи хетероциклени N-N лиганди; 3) Ru-DMSO нитрозилни съединения. Някои от тези вещества проявяват изразени антиметастатични свойства, които са сравними, а в някои случаи и по-добре изразени от тези на NAMI-A. До момента механизмът на действие и мишената/ите, която те атакуват все още не са напълно изяснени (Alessio et al., 2004).

Комплексната сол на Ru(III) KP1019 предизвиква образуване на H₂O₂ и причинява скъсвания в ДНК молекулата в клетки от карцином на дебелото черво (Kapitza et al.,

2005). Съобщено е и за обещаващия антитуморен ефект на 2-аминотиазол рутенат (III) (Mura et al., 2005). Приложението на съединения, съдържащи Ru(II) води до спиране на клетъчния цикъл във фаза G1 и до апоптоза в клетки от невробластом, глиобластом и лимфоидни тумори, като активността им е поне колкото тази на цисплатината (Gaiddon et al., 2005).

Създаването на метални съединения за нуждите на химиотерапията на злокачествените новообразувания не е лесна задача. Известно е, че натрупването на метални йони в организма би могло да има и опасни последици. Достатъчно е да споменем, че редица метали и метални съединения са потенциални мутагени и канцерогени (Domingo, 1994; Desoize, 2003). Ето защо винаги трябва да се има предвид биологичното разпределение и отстраняването (clearance) на металните комплекси от организма, техните фармакологични свойства. Казано накратко, за да представляват интерес за клиничната практика, тези вещества трябва да отговарят на следните основни изисквания: 1) Да са разтворими и стабилни във физиологични течности; 2) Успешно да се пренасят в кръвта, лесно да преминават през клетъчните мембрани; 3) Да разграничават злокачествено трансформирания от нормалните клетки; 4) Да са ефективни при ракови клетки устойчиви към антитуморни препарати (Kostova, 2005).

Получените от нас резултати показват, че съединенията на Ru(III) с Шифови бази представляват интерес за експерименталната онкология и онкофармакология и изследванията в тази област трябва да бъдат продължени и задълбочени. Това не само ще допринесе за изучаването на биологичните активности на този метал, както и на Шифовите бази, но и ще помогне на учените да намерят най-подходящата формула на евентуален бъдещ антитуморен препарат с минимизиране на страничните ефекти и преодоляване на лекарствената резистентност.

5.10. Туморните стволови клетки участват в туморната инициация, метастазирането, ангиогенезата и лекарствената резистентност, поради което терапевтичното насочване към тях може да бъде от полза за успеха на лечението при пациенти със злокачествени новообразувания, включително карцином на гърдата. Терапевтичните подходи могат да бъдат насочени чрез въздействие върху различни функционални и молекулярни белези на ТСК, като клетъчни маркери на стволовост, сигнални пътища, отговорни за самообновяването, взаимодействието между тумора и микросредата и пътищата за лекарствена резистентност, управлявани от ТСК.

В изпълнение на задачата на представения Дисертационен труд за идентифициране на популация от туморни стволови клетки, беше извършено

имунохистохимично изследване на експресията на биомаркерите, идентифициращи туморните стволови клетки при карцином на гърдата CD44, CD24 и ALDH1 на стандартно получени хистологични проби, фиксирани с формалин и включени в парафин (FFPE), без да е необходима подготовка на отделни образци за имунофлуоресцентно изследване. Достъпността и възможността за диагностично приложение на използваната от нас методика за имунохистохимична верификация на експресията на тъканни биомаркери, ще допринесе за приложението на концепцията за туморни стволови клетки (ТСК) в клиничната практика, а установяването на биологичните характеристики на туморните стволови клетки може да послужи за прогностични и диагностични цели.

Обстойният анализ на получените резултати прави видима връзката между наличието на туморна клетъчна популация със стволов фенотип CD44⁺/CD24⁻/ALDH1⁺ и възникването на регионални и далечни метастатични огнища, както и с развитието на туморен рецидив. Определянето на експресията на тези маркери в първия получен хистологичен материал (tru-cut биопсия) в процеса на диагностиката би било с висока информативна стойност по отношение на биологичното поведение на тумора, по-специално за оценка на метастатичния му потенциал.

Проучванията върху ролята на ТСК като източник на метастатично заболяване и резистентност към химио- и лъчетерапия и уточняването на механизмите и пътищата, които стимулират пролиферацията на туморните клетки, може да се приложи за разработване на ефективни лечебни стратегии за елиминиране на туморните стволови клетки. Идентифицирането и количественото определяне на ТСК с помощта на маркери за стволовост и внедряването на ТСК-насочени терапии може да революционизира парадигмата за лечение на злокачествените тумори. ТСК могат да станат потенциални прогностични и предиктивни биомаркери за метастатична болест и химиорезистентност, а премахването им може да подобри общата преживяемост на пациентите.

5.11. Възможността да се тества ефективността на терапевтичните препарати директно върху тумора на конкретен пациент представлява голяма стъпка към персонализиран подход в медицинската онкология. Получените от тумори на пациенти първични клетъчни култури, ксенографти и органоиди са функционални модели, които представляват пряка реализация на идеята за персонализирана медицина в онкологичната практика. Тези моделни системи могат да помогнат за изясняване на потенциалните съпътстващи фактори и механизми на резистентност, така че да могат да се разработят и тестват рационални комбинации в подкрепа на клиничното им внедряване.

Набелязаната от нас стратегия за получаване на първични култури от рак на млечна жлеза и малигнени мезенхимни тумори при човек, както и изпълнимото в кратък срок изследване на чувствителността им към конвенционални и нови антитуморни агенти, разкрива възможност за предварително изпитване на чувствителността на тумора на пациенти с онкологично заболяване към химиотерапевтични препарати, което би могло да подпомогне избора на терапия, особено при туморни рецидиви, възникнали след предходно лечение и е стъпка напред към персонализираната медицина.

6. ИЗВОДИ

Въз основа на получените оригинални експериментални данни бяха направени следните по-важни изводи:

1. С помощта на комплексен подход, включващ изпълнение на краткосрочни (3-72 часа, с монослойни култури) и дългосрочни (41-43 дни, с 3D колонии от туморни клетки) експерименти и методи с различни клетъчни мишени (молекули, органели) и механизми на действие, за пръв път беше установено, че изпитваните съединения на Ru(II) и Ru(III) намаляват в различна степен преживяемостта и/или пролиферативната способност на използваните като моделни системи туморни клетъчни култури. Наблюдаваният ефект се усилва с увеличаването на концентрацията и времето на въздействие.
2. Комплексите на Ru(III) с Шифови бази в по-висока степен намаляват преживяемостта и потискат 2D и 3D растежа на третираните клетки в сравнение с техния предшественик – комплексът на Ru(II).
3. Наблюдаван беше клетъчно-специфичен отговор: комплексът RuSalpn проявява най-силно изразен цитотоксичен ефект при клетките от линия MDA-MB-231 и HT29 и най-слаб при Saos-2, докато Ru Valdiamci показва най-висока ефективност при MDA-MB-231 и Saos-2 и най-ниска при нетуморните клетъчни линии Lep3 и MCF10. Комплексите RuValdiamci, Ru Salpn, Ru Salen, Ru Salphen проявяват селективен ефект спрямо туморните в сравнение с нетуморните клетъчни линии.
4. Изследваните новосинтезирани комплекси на Ru(II)/(III) с шифови бази предизвикват апоптотичен тип клетъчна смърт, установена по цитоморфологичните изменения, експресия на фосфатидилсерин и свързването му с Annexin V при третираните постоянни клетъчни линии.
5. Стимулираната от комплекси на Ru(III) с шифови бази в началните 3-24 часа автофагия завършва с клетъчна смърт.
6. Третирането с комплексите RuValen (10 $\mu\text{g/ml}$) и RuValphen (25 $\mu\text{g/ml}$) потиска миграционния капацитет на клетки от линия MDA-MB-231 (тройно негативен карцином на гърдата); RuValpn в концентрация 100 $\mu\text{g/ml}$ е ефективен при клетъчни линии MCF7 (карцином на гърдата луминален тип A) и HT29 (колоректален карцином); Комплексите RuValphen и RuValpn в концентрация $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ и RuValpnol

и RuValdiamci ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$) напълно инхибират миграционния капацитет на плъши саркомни клетки от линия LSR-SF-SR.

7. С най-висока цитотоксична / антитуморна активност се отличават комплексите RuSalpn и RuValdiamci, чиято ефективност превъзхожда или е сравнима с тази на утвърдените в клиничната онкологична практика препарати цисплатина, оксалиплатина и епирубицин. Цитотоксичното / антитуморното действие на тези вещества се проявява и при първични култури от карцином на млечната жлеза, пресъздаващи максимално близко биологията и поведението на злокачествените тумори.

8. Обстойният анализ на получените резултати прави видима връзката между наличието на туморна клетъчна популация със стволов фенотип $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-/\text{ALDH1}^+$ и възникването на регионални и далечни метастатични огнища, както и с развитието на туморен рецидив. Определянето на експресията на тези маркери в първия получен хистологичен материал (tru-cut биопсия) в процеса на диагностиката би било с висока информативна стойност по отношение на биологичното поведение на тумора, по-специално за оценка на метастатичния му потенциал.

7. ПРИНОСИ

Оригинални научни приноси

1. За пръв път са получени данни за влиянието на 8 комплекса на Ru(III) и техен предшественик с Ru(II) върху преживяемостта и пролиферативната активност на клетки от различни хистологични типове тумори при човек, предизвиканите в тях цитоморфологични изменения и типа на клетъчната смърт.
2. Установена е обещаващата антитуморна активност на комплексите RuSalpn и RuValdiamci при клетки от тройно негативен рак на гърдата и остеосарком при човек, за които наличните в момента терапевтични възможности са крайно ограничени. RuSalpn и RuValdiamci имат селективно действие по отношение на туморните клетки, потискат миграцията и инвазивността им, ефектът им е сравним с този на конвенционалните антинеопластични препарати цисплатина, оксалиплатина, епирубицин и паклитаксел.
3. За пръв път е доказана способността на комплекси на Ru II/ III с шифови бази да потискат 2D- и 3D растежа и да предизвикват апоптоза при култивирани в лабораторни условия клетки, експресиращи онкогена v-src (плъща линия LSR-SF-SR), чиито клетъчни аналози участват в патогенезата на голям брой неоплазии у човека и животните и са разпознати като обещаваща мишена за прицелна антитуморна терапия.
4. Получена е сравнителна информация за цитотоксична/антитуморна активност на изпитваните комплекси на Ru(II) и Ru(III) с различни лиганди, която ще подпомогне създаването на нови високоефективни антинеопластични средства.

Потвърдителни научно - приложни приноси

Оптимизирани и въведени в лабораторната ни дейност са:

1. Подход за визуализиране на автофагия в третиран с метални комплекси туморни и нетуморни клетки, което улеснява търсенията ни в изучаването на двойнствената роля на този процес в канцерогенезата, оцеляването и клетъчната смърт както и за идентифицирането на иновативни антитуморни средства.
2. Метод за получаване и имуноцитохимично фенотипизиране на първични култури от карцином на млечна жлеза и малигнени мезенхимни тумори при човек, както и за

изследването в кратък срок на чувствителността им към конвенционални и нови противоракови агенти. Тази стратегия разкрива възможност за предварително изпитване на чувствителността на тумора на пациенти с онкологично заболяване към химиотерапевтични препарати, което би могло да подпомогне избора на терапия, особено при туморни рецидиви, възникнали след предходно лечение и е стъпка напред към персонализираната медицина.

3. Имунохистохимично изследване на експресията на биомаркерите, идентифициращи туморните стволови клетки при карцином на гърдата CD44, CD24 и ALDH1 на стандартно получени хистологични проби, фиксирани с формалин и включени в парафин (FFPE), без да е необходима подготовка на отделни образци за имунофлуоресцентно изследване. Достъпността и възможността за диагностично приложение на използваната от нас методика за имунохистохимична верификация на експресията на тъканни биомаркери, ще допринесе за приложението на концепцията за туморни стволови клетки (ТСК) в клиничната практика, а установяването на биологичните характеристики на туморните стволови клетки може да послужи за прогностични и диагностични цели.

8. Списък с научни публикации по темата на дисертацията

1. *Zhivkova, T., *Petrova, Z., Dyakova, L., Spasov, R., Ekeh, Ch., Abudalleh, A., Culita, D.-C., Marinescu, G., Alexandrova, R. Cytotoxic activity and ability to induce autophagy in human triple negative breast cancer cell. *Acta Morphologica et Anthropologica*, 27, 1-2, Prof. Marin Drinov Publishing House of Bulg. Acad. Sci., 2020, ISSN:1311-8773 (print); 2535-0811 (online), 29-37 Без JCR или SJR – индексирани в Web of Science
<http://www.iempam.bas.bg/journals/acta/acta27a/29-37.pdf>

* двамата автори имат еднакъв принос към публикуваното изследване.

Статията е цитирана в:

Ertürk, Ö., Değirmenci, A., Yurdakul Ertürk, E., Atlı Şekeroğlu, Z., Çol Ayvaz, M., Konaş Yedier, S. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of some analgesic or anti-inflammatory drugs. *Biologia*, 2021, 76(8), 2365–2379. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00755-4>, @2021

2. Alexandrova, R., Spasov, R., Petrova, Z., Zhivkova, T., Dyakova, L., Dinev, D., Glavcheva, M., Andonodva-Lilova, B., Abudalleh, A., Georgieva, M., Miloshev, G., Culita, D.-C., Marinescu, G., Aleexeva, V., Podlipnik, K. Experimental strategy for in vitro evaluation of cytotoxic / antitumor properties of new metal complexes with different ligands. *Trakia Journal of Sciences*, 17, 2, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria, 2019, ISSN:1312-1723 (print); 1313-3551 (online), DOI:doi:10.15547/tjs.2019.s.02.019, 82-89 Без JCR или SJR – индексирани в Web of Science

http://tru.unisz.bg/tsj/Volume%2017,%202019,%20Supplement%202,%20Series%20Biomedical%20Sciences/19_R.Alexandrova.pdf

3. Abudalleh, A., Petrova, Z., Ivanov, D., Karadjova, I., Alexandrova, R., Alexandrov, M.. Ammonium Vanadate Inhibits the Growth of Transplantable Hepatoma of Zajdela in Rats. *Proceedings of Academy's World international Conference*, Krakow, Poland 13-14 October 2018, IRAJ journal listed in University Library, 2018, ISBN:978-93-87405-18-9, ISSN:2320-2106 Международно неакадемично издателство

https://www.worldresearchlibrary.org/up_proc/pdf/2039-15446921997-10.pdf

9. Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. Доклад пред научни мероприятия в страната

1.1. **Zdravka Petrova**, Anna Kouncheva, Pencho Beykov, Radostina Alexandrova. Ruthenium – one metal with many faces. Ninth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, July 16-18, 2018, Sofia, Bulgaria – доклад

1.2. **Zdravka Petrova**, Anna Kouncheva, Boyka Andonova-Lilova, Desislav Dinev, Rossen Spasov, Daniela Cristina Culita, Gabriela Marinescu, Luminita Patron, Radostina Alexandrova.

Ruthenium (III) complexes with Schiff bases – effect of viability and proliferation of human and rat virus-transformed cells. Ninth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, July 16-18, 2018, Sofia, Bulgaria – доклад

1.3. **Здравка Петрова**, Милена Главчева, Росен Спасов, Десислав Динев, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова.

Предизвикани с новосинтезирани комплекси на рутений (III) с шифови бази цитопатологични изменения в туморни клетки, Трети Докторантски симпозиум „Молекулярна биология – от молекулите до клетките и обратно“, 7-8 март 2019г., София, БАН - Институт по молекулярна биология „Акад.Румен Цанев“ - доклад

1.4. **Здравка Петрова**, Милена Главчева, Десислав Динев, Росен Спасов, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Луминица Патрон, Радостина Александрова.

Цитотоксични / цитопатологични изменения в човешки туморни клетки след въздействие с новосинтезирани комплекси на рутений (III) с шифови бази
Национална конференция по патология, 11.04-14.04.2019г., гр.Велинград – постер

1.5 **Здравка Петрова**, Росен Спасов, Десислав Динев, Радостина Александрова.

Автофагията – път към оцеляване или клетъчна смърт за туморните клетки. Десета Работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските проучвания“, 03-05 юли 2019 г. , София, БАН –ИЕМПАМ - доклад

1.6. **Здравка Петрова**, Милена Главчева, Десислав Динев, Росен Спасов, Габриела Маринеску, Даниела-Кристина Кулица, Радостина Александрова. Проучвания върху потенциалната цитотоксичната/ антитуморна активност на новосинтезирани комплекси на Ru(III) с шифови бази, Втори интердисциплинарен докторантски форум, 29-31 август 2019г., Боровец - постер

2. Доклад пред научно мероприятие в чужбина или пред международно научно мероприятие у нас

2.1. **Z. Petrova**, D. Dinev, B. Andonova-Lilova, R. Spasov, A. Kouncheva, G. Marinescu, D.-C. Culita, L. Patron, O. Azmy, R. Alexandrova. Ru(III) complexes with Schiff bases significantly decrease viability and/or proliferation of cultured cancer cells. VII National Conference with international participation “Morphological Days”, June 8 – 10, 2018, Sofia, Bulgaria - доклад

2.2. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Mahdi Abudalleh, Milena Georgieva, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron. Ruthenium (III) complexes containing Schiff base ligands with promising anticancer activity. 2nd WG meeting – MuTaLig COST Action CA 15135, Instituto Universitario de Bio-Organica “Antonio González” (IUBO-AG) - Universidad de La Laguna, Tenerife (Spain), March 15-16, 2018 - *постер*

2.3. Zhivkova Tanya, **Z. Petrova**, D. Dinev, B. Andonova-Lilova, R. Spasov, A. Kouncheva, G. Marinescu, D. C. Culita, L. Patron, R. Alexandrova. Cytotoxic activity of Ru(III) complexes with Schiff bases. XVII International Congress of Medical Sciences, 10 - 13 May 2018 Sofia, Bulgaria, p.88-89 – *постер*

2.4. **Petrova Zdravka**, Dinev Desislav, Andonova-Lilova Boyka, Glavcheva Milena, Spasov Rossen, Kouncheva Anna, Marinescu Gabriela, Culita Daniela-Cristina, Patron Luminita, Alexandrova Radostina. Ruthenium (III) complexes containing Schiff base ligands express cytotoxic activity in human cancer cell lines. New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection“, June 28-29, 2018, Timisoara, Romania - *постер*

2.5. Alexandrova, R, **Z. Petrova**. Briefly about some of the most popular cytotoxicity assays. XIII Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products with International participation, 19-21 November 2018, Sofia, Bulgaria – *доклад*

2.6 Dinev D., **Petrova Z.**, Zhivkova T., Spasov R., Georgieva M., Miloshev G., Patron L., Marinescu G., Culita D.C., Alexandrova R. Cytotoxic activity of Zn(II)/Au(I), Zn(II)/Ag(I) and Ru(III) complexes with Schiff base Salen in human cancer and non-cancer cells. 54th Congress of the European Societies of Toxicology “Toxicology out of the box” 02-05 September, Brussels, Belgium – *постер*

2.7. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Abedulkadir Abudalleh, Milena Glavcheva, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron. Ruthenium(III) complexes containing Schiff base ligands suppress 2D and 3D growth of cancer cells. Годишна среща на участниците в проект по програмата COST – Акция CA16119 на тема: „In vitro 3-D total cell guidance and fitness (Cellfit)” „Насоки за оптимално поддържане на 3D клетъчни култури in vitro”, о-в Хвар, Република Хърватска, 2018 г. 2-3 октомври 2018 г – *доклад*

2.8. **ZdravkaPetrova**, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova, Milena Glavcheva, Rossen Spasov, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Abedulkadir Abudalleh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Radostina Alexandrova. Ru(III) complexes with Schiff bases as inducers of apoptosis and autophagy. Annualmeeting of the COST Action “European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagyknowledge” (TRANSAUTOPHAGY, CA15138), Sofia, Bulgaria, 23-25 April, 2019 - *постер*

2.9. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Tanya Zhivkova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh, Lora Dyakova, RossenSpasov, Chukwuemeka ObinnaEkeh, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita. The many faces of autophagy:

what about cancer? New trends and strategies in the chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, technique and environmental protection“, June 6-7, 2019, Timisoara, Romania - доклад

2.10. **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova, Rossen Spasov, Gabriela Marinescu, Daniela-Cristina Culita, Luminita Patron, Radostina Alexandrova, Ru (III) complexes with schiff bases effectively inhibit 2d and 3d growth of cultured human and animal tumor cells – Seventh International Conference on Radiation in Various Fields of Research (RAD 2019 Conference), Herceg Novi, Montenegro, June 10-14 , 2019 - доклад

2.11. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Boyka Andonova-Lilova, Rossen Spasov, Gabriela Marinescu, Daniela Cristina Culita, Luminita Patron, Ru(III) complexes with schiff bases as promising cytotoxic agents in cultured human cancer cells, 18th Annual Congress on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems Diabetes & Nursing Care and June 27-28, 2019 | Amsterdam, Netherlands - доклад

2.12. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Milena Glavcheva, Rossen Spasov, Tanya Zhivkova, Lora Dyakova, Boyka Andonova-Lilova, Abedulkadir Abudalleh. 3D cancer cell colonies as model systems in searching for new antitumor agents. XXIV Национален конгрес на Българското анатомично дружество с международно участие, 31 май - 02 юни, 2019 - постер

2.13. Radostina Alexandrova, **Zdravka Petrova**, Desislav Dinev, Rossen Spasov, In the world of autophagy: what about cancer? International Conference and Exhibition on Cancer&Therapeutics, 2019 November 18-19 , Malaysia - доклад

10. Благодарности към научно-изследователски проекти

Проучването е проведено с финансовата подкрепа на:

Договор №ДКОСТ 01-16/2017; Договор №ДКОСТ 01-19/2017 и Договор №ДКОСТ 01-10/2018, Фонд „Научни изследвания“, Министерство на образованието и науката, Република България;

Акция CA15135 на Европейската програма COST “MuTaLig” - Action CA 15135 of the European COST program on topic: „Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process” (MuTaLig)“

Акция CA15138 на Европейската програма COST “TRANSAUTOPHAGY” - Action CA 15138 of the European COST program on topic: „European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagy knowledge”.

Акция CA16119 на Европейската програма COST “CellFit” - Action CA 16119 of the European COST program on topic: "In vitro 3-D total cell guidance and fitness” (CellFit)".

Договор за двустранно сътрудничество между Българска академия на науките (ИЕМПАМ-БАН) и Румънската академия (Институт по физико-химия „Илие Мургулеску“ в Букурещ и Институт по химия в Тимишоара).

Проект BG05M2OP001-2.009-0019-C01/02.06.2017, финансиран по Оперативна програма “Наука и образование за интелигентен растеж”,