

**СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО
ФИЗИОЛОГИЯ, ПАТОФИЗИОЛОГИЯ И
ФАРМАКОЛОГИЯ ПРИ ВАК**

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ, ФАРМАКОТЕРАПИЯ И
ТОКСИКОЛОГИЯ**

маг. фарм. Мая Маргаритова Захариева

**ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ ФАРМАКОДИНАМИЧНИТЕ
ЕФЕКТИ НА ERUFOSINE ПРИ ТУМОРНО-
ТРАНСФОРМИРАНИ И НОРМАЛНИ
ХЕМОПОЕТИЧНИ КЛЕТКИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертация за присъждане на образователната и научна
степен “ДОКТОР”**

по научна специалност: “Фармакология”, шифър 03.01.24

**Научен ръководител: Проф. д-р М. Караиванова, д.м.н.
Научен консултант: Проф. М. R. Berger, MD**

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:

Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

Проф. д-р Мила Власковска, д.м.н.

София, 2007

Дисертационният труд е написан на 303 страници и включва 49 таблици, 70 фигури и 16 приложения. Използвани са 273 литературни източника, от които 5 на кирилица и 268 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден на 26 юни 2007 г. на заседание на Катедрения съвет на Катедра “Фармакология, фармакотерапия и токсикология” при Фармацевтичен факултет, Медицински университет - София, с разширен състав и е насочен за защита към Специализирания научен съвет по физиология, патофизиология и фармакология при ВАК.

Дисертантката е редовен докторант към Катедра “Фармакология, фармакотерапия и токсикология” при Фармацевтичен факултет на Медицински университет - София.

Защитата на дисертацията ще се състои на 29. 11. 2007 г. от 13:30 часа, в заседателната зала на Института по физиология на растенията при БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 21, II-ри етаж, на заседание на СНС по физиология, патофизиология и фармакология при ВАК.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Института по невробиология про БАН, “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, II-ри етаж.

Използвани съкращения

ASO, ASO	Антисенс-олигонуклеотид
АФХ	Алкилфосфохолини
Abl	Абелсонова тирозин-киназа
Bad	Проапоптозен протеин, свързан с митохондриалния път за активиране на апоптозата
Cdk	Cyclin dependent kinases, циклин-зависими кинази
CFUs	Colony Forming Units, колония-образуващи единици
CML	Хронична миелоидна левкемия
hpRNA	бримкова РНК
LTBMCCs	Long Term Bone Marrow Cell Cultures, дълготрайни костномозъчни култури
NSO	Нонсенс-олигонуклеотид
PCR	polymerase chain reaction (полимеразна верижна реакция)
PKB	Protein kinase B, протеин-киназа В
PTEN	Phosphatase and tensin homolog on chromosome ten
qPCR	квантитативен (количествен) PCR
Rb	Retinoblastoma protein, ретинобластомен протеин
RNA, РНК	Рибонуклеинова киселина
RNAi, РНКи	RNA-interference, РНК-интерференция
WT-клетки	wild type клетки

Въведение

Лечението на злокачествените тумори се осъществява с различни цитостатични лекарства, които се отличават по механизъм на действие, кинетика и начин на елиминиране. Често техният терапевтичен ефект се съпътства от сериозни нежелани странични реакции от различни органи и системи. Повечето от цитостатиците имат изразено потискащо действие върху хемопоетичната система, като най-силно се засяга левкопоезата. Левкопеничният ефект е желан при хемобластозите, но приложението на агресивни цитостатични комбинации или провеждането на продължителна полихимиотерапия при лечението на неоплазиите може да причини тежка медикаментозна левкопения и гранулоцитопения - състояния, които изискват скъпоструващо и невинаги ефикасно лечение с рекомбинантни растежни фактори и системни хемотрансфузии. Лекарствено индуцираната аплазия на костния мозък понякога в много случаи има прогресивно развитие и лоша прогноза поради наличието на анемия, хеморагии и риск от вторични инфекции. В тази връзка проучването върху цитостатични съединения с ниска хематологична токсичност е особено актуално и важно за терапевтичната практика. Алкилфосфохолините обединяват наличието на цитотоксичен ефект спрямо злокачествено трансформирани клетки със стимулация на хемопоетичните прогениторни клетки.

Днес, все повече се акцентира върху тезата, че злокачественото заболяване може да бъде продължително и добре контролирано с модерни фармакологични средства. В тази насока, създаването на нови лекарства, които са модулатори на патологичната сигнална трансдукция, както и разработването на нови терапевтични лекарствени схеми, ще позволят постигането на добър фармакологичен контрол и намаляване или премахване на хемодепресивния ефект на конвенционалните цитостатици.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

I. Цел

Цел на настоящето проучване е да се определи цитостатичният ефект на алкилфосфохолина Erufosine върху спектър от туморни клетъчни линии при самостоятелно и комбинирано приложение; да се изяснят механизмите на избирателна цитотоксичност, влиянието му върху нормалните хемопоеични клетки и върху различни сигнални биомолекули.

II. Задачи

1. Да се определи цитотоксичния и антипролиферативен ефект на Erufosine върху спектър от левкемични и туморно-клетъчни линии със сравнителен анализ на IC₅₀-стойностите.
2. Да се създадат дълготрайни култури от нормален миши костен мозък, върху които да се изследва протективното действие на Erufosine спрямо хемопоеични клетки при самостоятелно и комбинирано приложение.
3. Да се установи ефекта на комбинации между Erufosine и класически цитостатици върху спектър от левкемични клетъчни линии.
4. Чрез поточно-цитометрично изследване да се определи влиянието на Erufosine в комбинация с антиметаболити или антрациклинови антибиотици върху разпределението на клетките в отделните фази на клетъчния цикъл.
5. Да се установи влиянието на Erufosine върху реорганизацията на липидните рафтове в клетъчната мембрана и тяхното съдържание по отношение на сигналните молекули BCR-ABL, ABL и PKB/AKT.
6. Да се изследва влиянието на Erufosine върху протеини на сигналните трансдукционни пътища, които са свързани с онкопротеина BCR-ABL, с регулацията на клетъчния цикъл и с апоптозата - Rb, PKB/AKT, PTEN, p27, Bad, BCL-xL, каспаза 8 и каспаза 9.
7. Да се установи цитотоксичния ефект на Erufosine върху модели на левкемични клетъчни линии с потисната експресия на ретинобластомния протеин Rb.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ*

1. Лекарствени съединения, изследвани в настоящата разработка

В настоящия дисертационен труд бяха използвани следните фармакологични агенти: Erufosine, Imatinib, Epirubicine, Bendamustine, Cytosine arabinoside (Ara C), Pemetrexede и Gemcitabine.

2. Клетъчни тест-системи

2.1. Клетъчни линии

K-562, BV-173, SKW-3, LAMA-84, AR-230, HD-MY-Z, HuT 78, KM-H2, MDA-MB, SAOS-2, 293T HEK

2.1. Първични клетки

Миши хемопоеични клетки, изолирани от мишки порода ICR и инбредни мишки порода C57/Bl6

3. Клетъчно култивиране

3.1.Култивиране на човешки клетъчни линии.

3.2.Изолиране и култивиране на дълготрайни костно-мозъчни култури

4. Методи за оценка на виталност и пролиферация на еукариотни клетки при *in vitro* условия

4.1.MTT-метод за оценка на клетъчна виталност

4.2.Метод за комбинирано приложение на две цитостатични вещества

4.3.CFU-метод за оценка на клоногенната способност на хемопоеични клетки.

5. Флуоцитометричен анализ на разпределение на клетките в различните фази на клетъчния цикъл

6. Молекулярно-биологични методи за анализ на генна експресия в еукариотни клетки

6.1.Замразяване на клетъчни проби за анализ на нуклеинови киселини и протеини

6.2.Изолиране и пречистване на тотална РНК от еукариотни клетки

6.3.Лизиране на еукариотни клетки, с цел изолиране на протеини за денатурационна гел-електрофореза

6.4.Изолиране на протеини от липидни рафтове в еукариотни клетки

6.5.Определяне на протеинова концентрация по метода на Pierce (BSA Protein Assay)

- 6.6. Фракциониране на протеини по молекулна маса в денатуриращ полиакриламиден гел (ПААГ)
- 6.7. Синтез на ДНК върху РНК-матрица (обратна транскрипция)
- 6.8. Полимеразна верижна реакция (PCR)
 - 6.8.1. Класически PCR
 - 6.8.2. Установяване на позитивни клонове от вирусния вектор pLL
 - 6.8.3. Количествен PCR
- 6.9. Разделяне на ДНК по молекулна маса чрез гел-електрофореза
- 6.10. Имуноблот
- 7. Методи за конструиране на рекомбинантна ДНК**
 - 7.1. Свързване на едноверижни комплементарни ДНК-олигонуклеотиди в двойноверижни ДНК-фрагменти (“annealing-реакция”)
 - 7.2. Подготовка на двойноверижни ДНК-фрагменти за клониране в плазмиден вектор
 - 7.3. Свързване на ДНК-олигонуклеотиди с отворения вектор pSUPER - лигазна реакция
 - 7.4. Селекция на позитивните клонове от вектора pSUPER чрез създаване на колонии от електрокомпетентни бактерии *E. coli* (DH 10 β)
 - 7.5. Реклониране на H1-shRNA касетата от плазмиден вектор pSUPER във вирусния вектор pLentiLox 3.7
- 8. Пречистване на нуклеинови киселини**
- 9. Рестрикционен анализ на плазмиди в агарозен гел**
- 10. Определяне на последователността на ДНК**
- 11. Трансфер на нуклеинови киселини в клетки при *in vitro* условия**
 - 11.1. Трансфер на нуклеинови киселини в прокариотни клетки
 - 11.2. Трансфер на нуклеинови киселини в еукариотни клетки
 - 11.2.1. Трансфер с катионни носители - нестабилна трансфекция
 - 11.2.2. Трансфер с лентивируси - стабилна трансфекция
 - 11.2.3. Оценка на ефективността на трансфекцията
- 12. Приготвяне на проби върху предметни стъкла по цитоспин-методика**
- 13. Обработка на експерименталните данни и статистика**
- * Пълното описание на всички използвани методи е представено в дисертационния труд с протоколи в приложение I - XVI.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

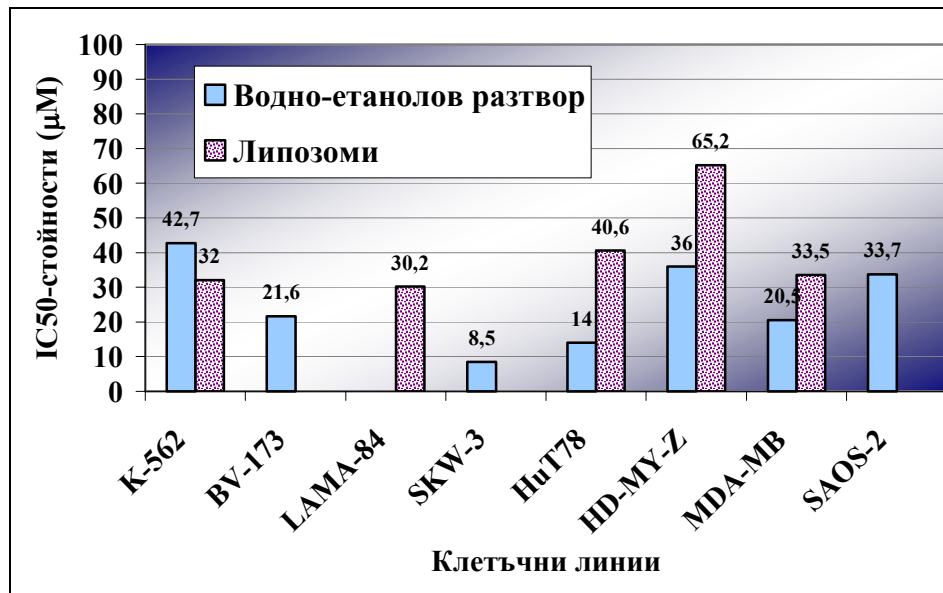
1. Проучване на влиянието на Erufosine върху туморно-клетъчни популации от различен произход

Антипролиферативният ефект на алкилфосфохолина Erufosine беше определен върху различни клетъчни моделни системи, които включват спектър от 4 човешки левкемични клетъчни линии, 2 лимфомни клетъчни линии и 2 клетъчни линии от солидни човешки тумори. Erufosine беше изследван в широк диапазон от концентрации (до 200 μM). Данните от проведените експерименти са представени в таблици и графики, където количеството витални клетки е отразено като процент от нетретираната контрола (Т/С %), приета за 100 %.

Данните за средната инхибираща концентрация на алкилфосфохолина Erufosine, получени след определяне на цитостатичния му ефект върху спектър от 8 туморно-клетъчни линии, са обобщени в табл. 1 и показват наличието на цитотоксичност след инкубационно време от 48 до 72 ч. Анализът на IC_{50} -стойностите свидетелства за рзличната чувствителност на клетъчните линии към действието на изследваното вещество. С най-висока чувствителност към водно-етанолов разтвор на Erufosine се характеризира Т-клетъчна малигнена линия SKW-3. Нейната средна инхибираща IC_{50} -стойност е най-ниска и се определя на 8,5 μM . Средната инхибираща концентрация, отчетена при лимфомната клетъчна линия NuT78 (7 и 14 μM), доказва нейната по-висока чувствителност към алкилфосфохолини в сравнение с лимфомните клетки HD-MY-Z (18 и 36 μM). Ефектът на водно-етанолов разтвор на Erufosine върху миелоидните клетъчни линии варира в зависимост от имунофенотипните характеристики на съответната линия. Най-чувствителни са миелоидните клетки BV-173, при които е отчетена средна инхибираща концентрация 21,6 μM . Най-резистентни са миелоидните K-562 клетки, които експресират най-много копия от онкогена BCR-ABL и чиято средна инхибираща концентрация възлиза на 42,7 μM след третиране с водно-етанолов разтвор на Erufosine. Наблюдавана е цитотоксичност на изследвания алкилфосфохолин и спрямо клетки от солидни човешки тумори - по-изразен ефект на водно-етаноловия разтвор е отчетен при клетки MDA-MB, с произход от карцином на млечната жлеза (табл. 1).

Сравнителният анализ на действието на водно-етаноловия разтвор на Erufosine и липозомната суспензия на същото вещество (фиг. 1), показва, че е налице по-бавно освобождаване на активната субстанция от липозомите. Липозомната форма постига максимален цитостатичен ефект при по-високи концентрации, в сравнение с водно-етаноловия разтвор, а средната инхибираща концентрация е с около 1,5 - 2 пъти по-висока при всичките клетъчни линии, с изключение на K- 562.

Установените данни за цитотоксичност на Erufosine върху 8 малигнени клетъчни линии разкриват неговите възможности за цитостатичен ефект при широк спектър от злокачествено трансформирани клетъчни линии и дават някои насоки за изучаване на механизма на неговия клетъчно-инхибиращ ефект. И макар, че не са намерени контрастни данни за чувствителност или нечувствителност на отделните клетъчни линии към Erufosine, може да се приеме, че алкилфосфохолинът има по-изразено инхибиращо влияние върху клетките от лимфоиден тип, в сравнение с миелоидните клетки и малигнените клетки с произход от солидни тумори.



Фиг. 1 IC₅₀-стойности на Erufosine при левкемични, лимфомни и туморни клетъчни линии (MTT-тест).

Табл. 1 IC₅₀-стойности на Erufosine при левкемични, лимфомни и туморни клетъчни линии.

Клетъчна линия	Лекарствена форма на Erufosine	Инкубационно време	IC ₅₀ *	
			[µg/mL]	[µM]
K-562 ^a	водно-етанолов разтвор	48	19,62	42,7
	липозоми	48	16,10	32,0
BV-173 ^a	водно-етанолов разтвор	48	11,07	21,6
LAMA-84 ^a	липозоми	48	15,09	30,2
SKW-3 ^b	водно-етанолов разтвор	48	4,02	8,5
HuT78 ^c	водно-етанолов разтвор	48	7,04	14,0
	липозоми	48	20,62	40,6
HD-MY-Z ^c	водно-етанолов разтвор	48	18,12	36,0
	липозоми	48	32,70	65,2
MDA-MB ^d	водно-етанолов разтвор	72	10,06	20,5
	липозоми	72	17,10	33,5
SAOS-2 ^d	водно-етанолов разтвор	72	17,10	33,7

* Средна инхибираща концентрация съответните стойности на конфиденциалност : CI (P < 0.05, n = 8), определена чрез полуавтоматичен МТТ тест.

a - миелоидна клетъчна линия; b - лимфоцитна; c - лимфомна клетъчна линия; d - клетъчна линия с произход от солидни тумори

2. Анализ на клоногенността на K-562 клетки след третиране с Erufosine.

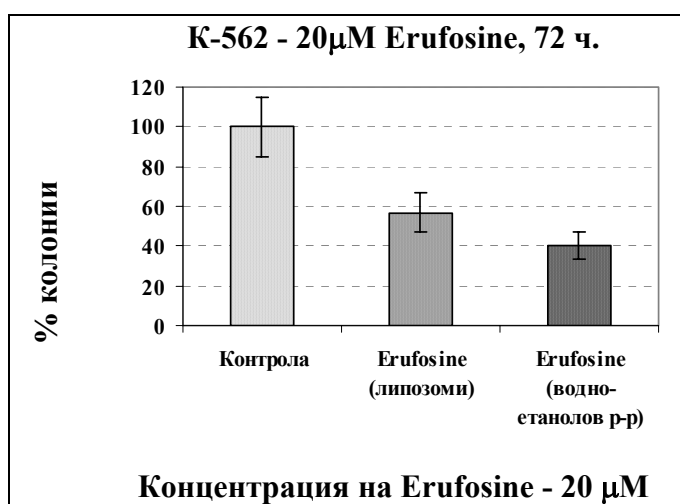
Левкемичните клетки K-562 бяха третирани с Erufosine под формата на водно-етанолов разтвор и липозоми в концентрация 20 µM за период от 72 часа, след което тяхната клоногенност беше изследвана чрез посяването им върху полутвърда среда и култивиране на колонии за период от 7 дни. След преброяване на колониите под инвертен микроскоп беше установено, че пролиферативната активност на K-562 клетките намалява спрямо нетретирания контрол до 57%, след третиране с Erufosine-липозоми и до 40% след третиране с водно-етаноловия разтвор (табл. 2, фиг. 2). Както се вижда от табл 3, приложението на 20 µM водно-етанолов разтвор води до образуване на по-малко колонии спрямо нетретирания контрол, отколкото при приложението на Erufosine под формата на липозоми. Получените данни свидетелстват за

инхибиращото влияние на Erufosine върху клоногенната активност на левкемичните клетки.

Табл. 2. Влияние на Erufosine (20 μ M) върху левкемичната клетъчна линия К-562 (CFU-тест).

Групи	T/C % ^a	SD	Продължителност на инкубация
Контрола	100	15	72 ч.
20 μ M Erufosine (липозоми)	57*	4	72 ч.
20 μ M Erufosine (водно-етанолов разтвор)	40*	4	72 ч.

^a Количество витални клетки, представени като процент от нетретираната контрола при n = 8 (брой проби в отделните групи). SD Стандартно отклонение. * P < 0,05 Статистически значима разлика спрямо нетретираната контрола. Статистическата значимост на получените данни е изчислена с помощта на компютърната програма Graph Pad Prizm 4.



Фиг. 2 Ефект на Erufosine върху клоногенността на левкемичната клетъчната линия К-562 след 72 ч. третиране с водно-етанолов разтвор или липозомна суспензия.

3. Проучване влиянието на Erufosine върху нормални костно-мозъчни клетъчни популации при самостоятелно приложение и в комбинация с клинично прилагани цитостатици

Данните от предклиничните изследвания на Erufosine, свидетелстващи за отсъствие на миелотоксичност и наличие дори на стимулиращ ефект върху нормалната хемопоеза при експериментални условия, ни насочиха към проучване влиянието на ефективни и безопасни в цитотоксично отношение комбинации на Erufosine и клинично прилагани цитостатици от различни фармакологични групи върху нормални костно-мозъчни клетки. Ние изследвахме възможностите за възстановяване на костно-мозъчното кръвотворене, след третиране с хемодепресивни цитостатици, чрез включване в

лекарствена схема с Erufosine. Ефективността на тези комбинации беше оценена при *in vitro* условия върху първични клетки от дълготрайни костно-мозъчни култури (LTBMCCs). Като компоненти на комбинираната лекарствена схема включихме цитостатиците Bendamustine, Ara C, Epirubicine, Pemetrexed и Gemcitabine. Концентрациите на клинично използваните цитостатици са подбрани въз основа на дозите, които се прилагат в онкотерапевтичната практика. Първичните култури бяха инкубирани с Erufosine за период от 24 ч. преди или след въздействие с цитостатика, приложен за еквивалентен период от време. При комбинациите [Erufosine и Pemetrexed] и [Erufosine и Gemcitabine] двата компонента бяха приложени едновременно за период от 24 ч. Третираните клетки бяха посети в полутвърда среда с метилцелуозна структура и растежът на колониите беше стимулиран с гранулоцитно-макрофагеален колония-стимулиращ фактор (gm GM-CSF). Образуваните колонии бяха преброени под инвертен микроскоп. Статистическата значимост на получените резултати беше изчислена след сравнение между средните стойности на отделните групи – нетретирана контрола, Erufosine, цитостатик и комбинация.

3.1. Изследване на ефекта на Erufosine и Bendamustine върху дълготрайни костно-мозъчни клетки след самостоятелно и последователно приложение.

При въздействие с 25 μ M и 50 μ M Bendamustine върху нормални първични костно-мозъчни популации в продължение на 24 ч. се отчита намаление на способността за пролиферация на първичните клетки съответно с 58% и 66% (табл. 3 и фиг. 3). Самостоятелното приложение на 30 μ M Erufosine не води до статистически значима разлика в броя на колониите в нетретираната контрола (приети за 100%) и колониите в пробите след въздействие с Erufosine (95%).

При третиране на първичните култури с Erufosine в продължение на 24 ч. преди или след инкубацията им с 25 μ M Bendamustine е установено значително увеличение на броя на колониите при пробата с двете съединения, в сравнение с пробата със самостоятелно приложен Bendamustine. В пробите, при които третирането с Erufosine предхожда Bendamustine, се отчитат 86% CFU спрямо нетретираната контрола, т. е. има 44%-но увеличение на броя на колониите спрямо самостоятелното приложение на Bendamustine. При приложение на

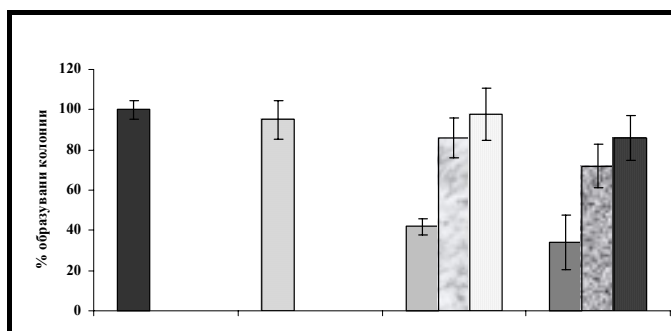
Erufosine, като втори компонент, броят на колонииите достига 98% спрямо нетретираната контрола, което представлява 56%-но увеличение на броя на колонииите спрямо Bendamustine. Тези данни показват, че при концентрация на Bendamustine 25 μM последователността на приложение на двете съединения няма значение за степента на протективния ефект спрямо хемопоеичните клетки.

При комбинация между по-високата концентрация Bendamustine (50 μM) и 30 μM Erufosine са получени данни, които свидетелстват за различна степен на повлияване на клоногенността на костно-мозъчните клетки, в зависимост от последователността на приложението им. Третирането с Erufosine преди Bendamustine, води до увеличение на колонииите спрямо нетретираната контрола с 38% спрямо Bendamustine самостоятелно (34%), т.е. отчетени са 72% CFU. При обратната последователност [Bendamustine $\Rightarrow$ Erufosine], броят на колонииите е 86% спрямо нетретираната контрола, което е с 52% повече от самостоятелното третиране с 50 μM Bendamustine. Тези резултати показват, че последователността на приложение на двете съединения в лекарствената схема е от важно значение, когато се използват високи концентрации на Bendamustine (50 μM).

Табл. 3 Влияние на комбинацията [Erufosine/Bendamustine] върху дълготрайни костно-мозъчни култури – статистическо сравнение между самостоятелно и последователно приложение.

Схема на приложение на лекарствата и статистическа значимост на получените резултати						T/C% ^b	SD
Нетретирана контрола ^a						100	± 5
30 μM Erufosine, 24 ч.						ns	± 10
25 μM Bendamustine, 24 ч.						***	± 4
50 μM Bendamustine, 24 ч.						***	± 14
30 μM Erufosine $\Rightarrow$ 25 μM Bendamustine						***	± 10
30 μM Erufosine $\Rightarrow$ 50 μM Bendamustine						***	± 11
25 μM Bendamustine $\Rightarrow$ 30 μM Erufosine						ns	± 13
50 μM Bendamustine $\Rightarrow$ 30 μM Erufosine						***	± 11

^a Произход на културите: мишки от порода ICR; ^bПроцент колония-образуващи единици спрямо нетретираната контрола; SD Стандартно отклонение; ^{ns} Липса на значима разлика между сравняваните стойности; * $P<0,05$ /** $P<0,001$ /** $P<0,0001$ Наличие на значима разлика между сравняваните стойности; $\Rightarrow$ Смяна на първото лекарство с второто през 24 ч.



Фиг. 3 Влияние на Erufosine и Bendamustine върху дълготрайни костно-мозъчни култури при самостоятелно и последователно приложение.

Легенда: ■ Нетретирана контрола, ▨ Erufosine (30 μ M, 24 ч.), ▩ Bendamustine (25 μ M, 24 ч.), □ Erufosine (30 μ M, 24 ч.) $\Rightarrow$ Bendamustine (25 μ M, 24 ч.), ▤ Bendamustine (25 μ M, 24 ч.) $\Rightarrow$ Erufosine (30 μ M, 24 ч.), ▥ Bendamustine (50 μ M, 24 ч.), ▦ Erufosine (30 μ M, 24 ч.) $\Rightarrow$ Bendamustine (50 μ M, 24 ч.), ▧ Bendamustine (50 μ M, 24 ч.) $\Rightarrow$ Erufosine (30 μ M, 24 ч.)

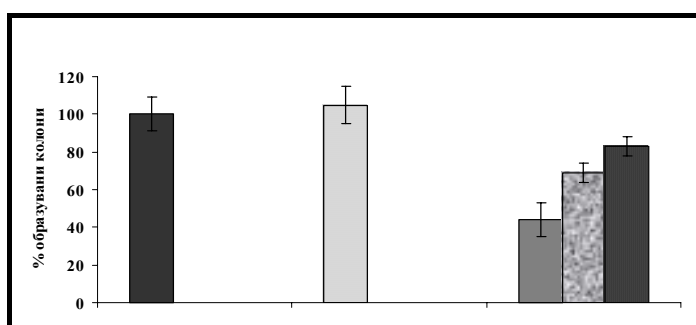
3.2. Влияние на Erufosine и Ara C върху нормални костно-мозъчни клетки след самостоятелно и последователно приложение.

При тази комбинация първичните култури бяха инкубирани в продължение на 24 ч. с 30 μ M Erufosine, 20 μ M Ara C или последователно с двата компонента, като в единия случай Erufosine беше приложен 24 ч. преди Ara C, а в другия случай беше определян ефектът на обратната последователност (табл. 4, фиг. 4). Както е показано в табл. 4, приложението на Erufosine самостоятелно не променя статистически значимо клоногенната активност на клетките спрямо нетретираната контрола. Прилагането само на Ara C намалява клоногенната способност на костно-мозъчни клетки до 44% и тази разлика е статистически значима както спрямо нетретираната контрола, така и спрямо Erufosine самостоятелно и пробите с двете последователности на приложение на съединенията. Третирането на първичните култури първоначално с Erufosine, в продължение на 24 ч. и след това с Ara C за същия период от време, води до увеличение на броя на колонии с 25% спрямо Ara C самостоятелно и този ефект представлява 69% CFUs от нетретираната контрола. При обратната последователност на третиране - първоначално 20 μ M Ara C, последвано от Erufosine за период от 24 ч., се отчита 39% увеличение на броя на образуваните колонии спрямо Ara C самостоятелно, което е 83% колонии от нетретираната контрола.

Табл. 4 Влияние на комбинацията [Erufosine/Ara C] върху дълготрайни костно-мозъчни култури – статистическо сравнение между самостоятелно и последователно приложение.

Схема на приложение на лекарствата и статистическа значимост на получените резултати					T/C% ⁶	SD
Нетретирана контрола ^a					100	± 9
30 µM Erufosine, 24 ч.	ns				105	± 10
20 µM Ara C, 24 ч.	**	**	**	**	44	± 9
30 µM Erufosine ⇒ 20 µM Ara C	*	**	**	**	69	± 5
20 µM Ara C ⇒ 30 µM Erufosine	*	**	*	*	83	± 5

^a Произход на културите: мишки от порода ICR; ⁶Процент колония-образуващи единици спрямо нетретираната контрола; SD Стандартно отклонение; ^{ns} Липса на значима разлика между сравняваните стойности; * P<0,05/** P<0,001 Наличие на значима разлика между сравняваните стойности; ⇒ Смяна на първото лекарство с второто през 24 ч.



Фиг. 4. Влияние на Erufosine и Ara C върху дълготрайни костно-мозъчни култури при самостоятелно и последователно приложение.

Легенда: ■ Нетретирана контрола, 24 ч., □ Erufosine (30 µM, 24 ч.), ■ Ara C (20 µM, 24 ч.), ▨ Erufosine (30 µM, 24 ч.) ⇒ Ara C (20 µM, 24 ч.), ■ Ara C (20 µM, 24 ч.) ⇒ Erufosine (30 µM, 24 ч.)

3.3. Влияние на Erufosine и Epirubicine върху костно-мозъчни клетки след самостоятелно и последователно приложение.

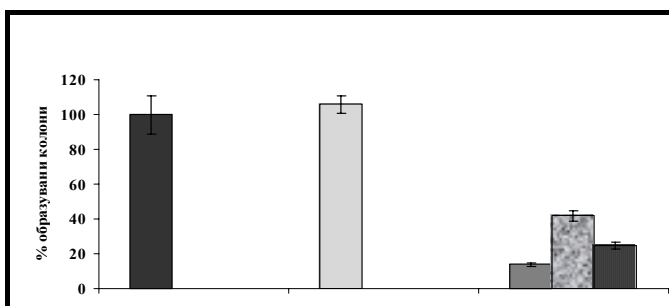
При тези изследвания, самостоятелното приложение на антрациклиновия антибиотик Epirubicine, в концентрация 1,25 µM, върху нормални костно-мозъчни клетки, е сравнено с две схеми на последователно приложение на 30 µM Erufosine и 1,25 µM Epirubicine (табл. 5 и фиг. 5). След третиране с Epirubicine, способността на клетките да образуват колонии в полутвърда среда е силно намалена - до 14%. При схемата [30 µM Erufosine, 24 ч. ⇒ 1,25 µM Epirubicine, 24 ч.] се отчита увеличение на броя на образуваните колонии с 28% спрямо самостоятелно приложение на Epirubicine и до наличие на 42% CFUs, при сравняване с нетретираната контрола. При другата последователност на приложение [1,25 µM Epirubicine, 24 ч. ⇒ 30 µM Erufosine, 24 ч.] увеличението на клоногенната активност на прогениторните клетки е 11% спрямо пробата с

1,25 μM Epirubicine. Общото количество колонии като процент от нетретираната контрола е 25%. Тези данни показват, че приложението на Epirubicine, след предварително третиране на клетките с алкилфосфохолина Erufosine, води до по-висока степен на запазване на тяхната клоногенност, в сравнение със самостоятелното приложение на антрациклиновия антибиотик.

Табл. 5. Влияние на комбинацията [Erufosine/Epirubicine] върху дълготрайни костно-мозъчни култури – статистическо сравнение между самостоятелното и последователно приложение.

Схема на приложение на лекарствата и статистическа значимост на получените резултати				T/C% ⁶	SD
Нетретирана контрола ^a				100	± 11
30 μM Erufosine, 24 ч.				ns	± 5
1,25 μM Epirubicine, 24 ч.				***	± 1
30 μM Erufosine $\Rightarrow$ 1,25 μM Epirubicine				***	± 3
1,25 μM Epirubicine $\Rightarrow$ 30 μM Erufosine				***	± 2

^a Произход на културите: мишки от порода ICR; ⁶Процент колония-образуващи единици спрямо нетретираната контрола; SD Стандартно отклонение; ^{ns} Липса на значима разлика между сравняваните стойности; ** $P < 0,001$ / *** $P < 0,0001$ Наличие на значима разлика между сравняваните стойности; $\Rightarrow$ Смяна на първото лекарство с второто през 24 ч.



Фиг. 5. Ефект на Erufosine и Epirubicine при дълготрайни костно-мозъчни култури от безпородни мишки (ICR) при самостоятелно и последователно приложение.

Легенда: ■ Нетретирана контрола, 24 ч., □ Erufosine (30 μM , 24 ч.), ■ Epirubicine (1,25 μM , 24 ч.), ▨ Erufosine (30 μM , 24 ч.) $\Rightarrow$ Epirubicine (1,25 μM , 24 ч.), ▤ Epirubicine (1,25 μM , 24 ч.) $\Rightarrow$ Erufosine (30 μM , 24 ч.).

3.4. Влияние на Erufosine, Gemcitabine и Pemetrexed върху хемопоеични костно-мозъчни клетки след самостоятелно и комбинирано приложение.

Приложението на Pemetrexed, в концентрация 0,05 μM за 24 ч., върху първични прогениторни клетки от дълготрайни костно-мозъчни култури, инхибира клоногенността на клетките с 44%, като броят на колония-образуваните единици е 56% от нетретираната контрола (табл. 6 и фиг. 6). Erufosine в концентрация 30% не повлиява клоногенната способност на

хемопоеичните клетки. След прилагане на комбинацията [30 μ M Erufosine + 0,05 μ M Pemetrexed], установихме статистически достоверно увеличение на броя на образуваните колонии с 56% спрямо пробата със самостоятелно приложение на Pemetrexed. При това не е определена статистически значима разлика между трите проби – третирана с комбинацията, нетретирана контрола и третирана с Erufosine. Тези данни показват, че се постига протекция на клетките от увреждащото действие на Pemetrexed до 100%.

Резултатите, представени в табл. 7 и на фиг. 6 показват, че Gemcitabine в ниска концентрация 0,05 μ M не променя клоногенната активност на клетките. При по-високата концентрация 0,1 μ M се отчита инхибиране на броя на колонии (81% T/C). Самостоятелното приложение на Erufosine (30 μ M) не повлиява образуването на колонии от прогениторните клетки. Аналогично, при третиране на клетките едновременно с Erufosine (30 μ M) и Gemcitabine (0,05 и 0,1 μ M) не се наблюдава промяна в клоногенната активност на прогениторните костно-мозъчни клетки в сравнение с нетретираната контрола – отчита се съответно 103% и 98% от нетретираната контрола. Получените данни дават основание да приемем, че Erufosine способства за стимулиране на клоногенната активност на прогениторните клетки най-изразено при комбинирането му с Pemetrexed и осигурява съхраняването на клоногенния им потенциал при комбиниране с Gemcitabine.

Табл. 6 Влияние на Erufosine и Pemetrexed върху дълготрайни костно-мозъчни култури при самостоятелно и комбинирано приложение – статистическо сравнение между самостоятелно и последователно приложение.

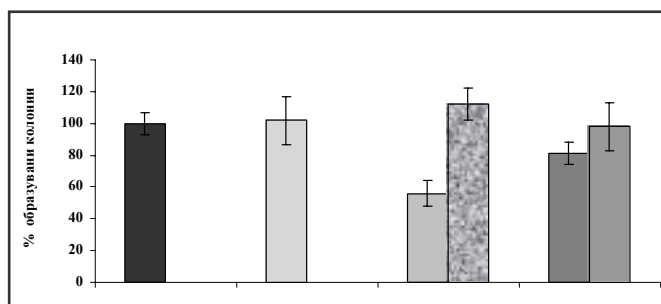
Схема на приложение на лекарствата и статистическа значимост на получените резултати				T/C% ^б	SD
Нетретирана контрола ^а				100	± 7
30 μ M Erufosine, 24 ч.				ns	± 8
0,05 μ M Pemetrexed				**	± 15
30 μ M Erufosine + 0,05 μ M Pemetrexed				**	± 10

^а Произход на културите: мишки от порода C57B6; ^бПроцент колония-образуващи единици спрямо нетретираната контрола; SD Стандартно отклонение; ^{ns} Липса на значима разлика между сравняваните стойности; ** P<0,001 Наличие на значима разлика между сравняваните стойности.

Табл. 7 Влияние на комбинацията между Erufosine и Gemcitabine върху дълготрайни костно-мозъчни култури – статистическо сравнение между самостоятелно и едновременно приложение.

Схема на приложение на лекарствата и статистическа значимост на получените резултати	T/C% ⁶	SD
Нетретирана контрола ^a	100	± 7
30 µM Erufosine, 24 ч.	ns	102 ± 15
0,05 µM Gemcitabine, 24 ч.	ns	100 ± 6
0,1 µM Gemcitabine, 24 ч.	*	81 ± 7
30 µM Erufosine + 0,05 µM Gemcitabine (24 ч.)	ns	103 ± 12
30 µM Erufosine + 0,1 µM Gemcitabine (24 ч.)	ns	98 ± 15

^a Произход на културите: мишки от порода C57B6; ⁶Процент колония-образуващи единици спрямо нетретираната контрола; SD Стандартно отклонение; ^{ns} Липса на значима разлика между сравняваните стойности; * P<0,05 Наличие на значима разлика между сравняваните стойности.



Фиг. 6. Влияние на Erufosine, Pemetrexed и Gemcitabine върху дълготрайни костно-мозъчни култури при самостоятелно и комбинирано приложение.

Легенда: ■ Нетретирана контрола, 24 ч., ■ Erufosine (30 µM, 24 ч.), ■ Pemetrexed (0,05 µM, 24 ч.), ■ Erufosine (30 µM) + Pemetrexed (0,05 µM), 24 ч., ■ Erufosine (30 µM) + Gemcitabine (0,1 µM), 24 ч

Анализът на данните от *in vitro* проучвания показва, че Erufosine може да коригира до голяма степен миелосупресивния ефект на класическите цитостатици върху нормалните хемопоеични прогениторни клетки. Такъв резултат се постига с концентрация на Erufosine, която е близка до средната инхибираща концентрация, установена в предишните ни изследвания за цитотоксичния ефект на алкилфосфохолина при туморно-трансформирани клетъчни линии. Използваната по-висока концентрация на Erufosine в тези изследвания (30 µM) не стимулира клоногенността на хемопоеичните популации, но и не причинява миелосупресия, което е важен елемент от профила на безопасност на алкилфосфохолина. При комбиниране с алкилиращия агент Bendamustine установихме, че включването на Erufosine постига стимулиране на клоногенната активност на нормалните хемопоеични клетки два пъти повече, отколкото третираната само с алкилатора проба.

Проучване върху фармакодинамичните ефекти на Erufosine при туморно-трансформирани и нормални хемопоеични клетки

Получените данни ни дават основание да приемем, че е налице протективен ефект на Erufosine спрямо костно-мозъчните клетки, който се изразява в намаляване на цитотоксичността на Bendamustin върху нормалните прогениторни хемопоеични клетки. Протективният ефект на Erufosine се проявява независимо от това, дали съединението е приложено преди или след алкилиращия агент, тъй като разликата в ефектите между двете комбинации не е статистически достоверна. Протективният ефект на Erufosine е по-слабо проявен при комбинацията с антиметаболита Ara C. Нашите резултати сочат за двукратно увеличение на броя на колонии в случая, когато Erufosine се прилага след антиметаболита. Микроскопският анализ на морфологичните промени на клетките потвърждава тези резултати и показва наличието на костно-мозъчни популации върху фибробластния монослой в пробите, които са третирани само с Erufosine или с комбинациите между Erufosine и Ara C. Силно изразена протекция на костно-мозъчните популации установихме при едновременно комбинирано приложение на Erufosine с мултитаргетния фолиев аналог Pemetrexed. При този експеримент отчетохме двойно увеличение на броя на гранулоцитно-макрофагеалните колонии, в сравнение със самостоятелното приложение на Pemetrexed. Най-слаба протекция установихме при последователно комбинирано приложение на Erufosine и антрациклиновия антибиотик Epirubicine. Хемопротективният ефект на комбинацията Erufosine/Epirubicine спрямо Epirubicine-индуцираната токсичност вероятно се дължи на намаляване на кластогенната активност на Epirubicine, както това е установено при проучване върху митогенната активност на комбинацията Epirubicine/HePC. Въз основа на тези литературни данни за комбинираното приложение на Erufosine и HePC и изхождайки от данните за кластогенната активност на Bendamustine, можем да предположим, че клетъчно-протективният ефект на Erufosine при комбинирането му с Bendamustine също така се дължи на намалената генотоксичност спрямо нормалните хемопоеични клетки.

4. Изследване на цитостатичния ефект на комбинации от Erufosine и клинично прилагани цитостатици при левкемични клетъчни линии

Цитостатиците обикновено се прилагат в комбинирана терапевтична схема, за да се постигне максимален антипролиферативен ефект и за превенция на развитието на резистентност. Процесът на въвеждане на ново терапевтично

Проучване върху фармакодинамичните ефекти на Erufosine при туморно-трансформирани и нормални хемопоеични клетки

средство в комбинация с вече известни цитостатици е сложен и е свързан с постигането на терапевтично полезни лекарствени взаимодействия. Изхождайки от данните за хемопротективния ефект на Erufosine, получени от нас при *in vitro* експерименти, ние си поставихме за цел да определим влиянието на Erufosine върху цитостатичния ефект на противотуморни лекарства, при същите комбинационни схеми върху спектър от левкемични и лимфомни клетъчни линии. В табл. 8 са представени обобщено ефектите на комбинации, състоящи се от Erufosine и клинично прилаган цитостатик, определени на базата на критериите за лекарствени взаимодействия. Като компоненти на комбиниранияте схеми включихме цитостатиците Bendamustine, Imatinib mesylate (Imatinib), Ara C и Epirubicine, приложени в концентрации, съобразени с дозите им в клиничната практика.

Установено беше, че Erufosine в комбинация с Bendamustine постига разнопосочни ефекти - синергизъм, ако се приложи комбинация с последователност [Bendamustine $\Rightarrow$ Erufosine] и антагонизъм - при обратната последователност [Erufosine $\Rightarrow$ Bendamustine]. Комбинацията от Erufosine и тирозинкиназния инхибитор Imatinib постига синергизъм в ефектите на двете съединения, който не е силно зависим от последователността на прилагане на отделните цитостатици, макар че при последователност [Imatinib $\Rightarrow$ Erufosine] се отчита сравнително по-силно изразен цитотоксичен ефект. Установено беше, че ефектът на тази комбинация зависи силно от приложените концентрации и вида на малигнените клетки. При комбиниране на Erufosine с антиметаболита Ara C се постига адитивен синергизъм само, ако първоначално третирането е с Erufosine, последвано от Ara C, докато при обратната последователност се наблюдава антагонизъм. При комбиниране на Erufosine с Epirubicine е постигнато потенциране на цитостатичния ефект само при AR-230 клетките, когато последователността на приложение е [Erufosine $\Rightarrow$ Epirubicine]. При клетъчната линия K-562 ефектите са различни и не така показателни за дефинитивна преценка на лекарствените взаимодействия.

Получените данни свидетелстват за сложността на комбинирането на Erufosine с цитостатици и зависимостта на лекарствените взаимодействия от концентрацията, вида на клетките и последователността на приложение. Хипотезата за предварително третиране с цитостатик и последващо с Erufosine, изградена върху неговия стимулиращ ефект спрямо пролиферацията на

Проучване върху фармакодинамичните ефекти на Erufosine при туморно-трансформирани и нормални хемопоетични клетки

нормалните хемопоеични клетки, не се доказва при всичките експериментални постановки. Тя сепотвърждава при комбинирането на Erufosine с Imatinib, като съединения, които повлияват процесите на сигнална трансдукция. В останалите случаи по-подходящо е първоначалното приложение на алкилфосфохолина, последвано от цитостатик. Наличието на антагонизъм при определени последователности на приложение върху една и съща клетъчна линия и при едни и същи концентрации, крие значителен риск при използването на терапевтични схеми за комбинирана химиотерапия с участието на Erufosine. В този аспект, интерес представлява изясняването на възможните механизми на благоприятни лекарствени взаимодействия с Erufosine, с които може да се създаде рационална основа за комбиране. На този етап *in vitro* изследванията позволяват да се определи взаимодействието между компонентите на комбинираната схема. Може да се приеме, че клетъчните моделни системи представляват прескринингова тест-система за определяне на вида на лекарствените взаимодействия.

Табл. 8 Ефект на комбинациите между Erufosine и цитостатични лекарства върху туморно-трансформирани клетъчни линии*.

Комбинации	Клетъчни линии			
	HD-MY-Z	K-562	BV-173	AR-230
Bendamustine/Erufosine	синергизъм	-	-	-
Erufosine/Bendamustine	антагонизъм	-	-	-
Imatinib/Erufosine	-	синергизъм	синергизъм	адитивен ефект/ антагонизъм
Erufosine/Imatinib	-	синергизъм	синергизъм	адитивен ефект/ антагонизъм
Ara C/Erufosine	-	синергизъм	-	антагонизъм
Erufosine/Ara C	-	адитивен ефект/ антагонизъм	-	адитивен ефект
Epirubicine/Erufosine	-	адитивен ефект/ антагонизъм		адитивен ефект
Erufosine/Epirubicine	-	адитивен ефект/ синергизъм		синергизъм

* Ефектите са определени по метода на B.B. Lundberg (1997).

5. Промени в клетъчния цикъл на левкемичните клетки K-562 след третиране с алкилфосфохолина Erufosine - самостоятелно или в комбинация с класически цитостатици.

В това изследване ние проследихме промените в клетъчния цикъл, настъпващи след третиране на K-562 клетките с Erufosine самостоятелно и в комбинация с Epirubicine или Ara C за период от 72 часа. Комбинираното третиране беше осъществено като последователно приложение на двете вещества от комбинацията по схемите: [48 ч. Epirubicine $\Rightarrow$ 24 ч. Erufosine] и [48 ч. Ara C $\Rightarrow$ 24 ч. Erufosine].

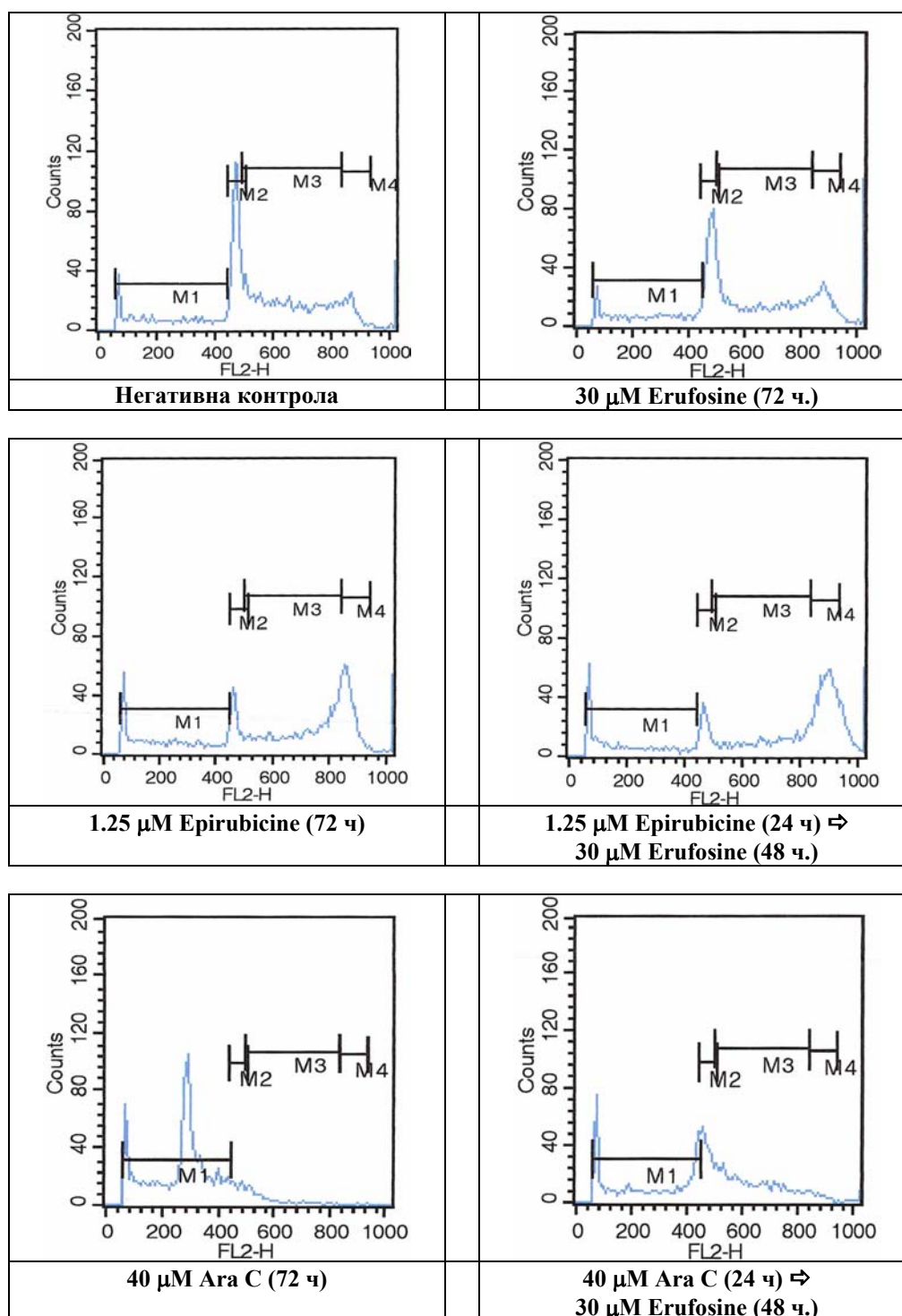
Резултатите от флуоцитометрията са представени в табл. 9 и на фиг. 7. От тези данни се вижда, че няма разлика в разпределението на клетките в отделните фази на клетъчния цикъл между негативната контрола и пробата, третирана с Erufosine. Промени в големината на клетъчните фракции в отделните фази на клетъчния цикъл наблюдавахме при пробите, третирани с Epirubicine или Ara C и с комбинацията цитостатик/Erufosine. Най-голям е процентът на апоптозни клетки в пробата, третирана с 40 μ M Ara C - 88.2 %. Сравнително около два пъти по-малка е клетъчната фракция от апоптозни клетки след третиране с комбинацията [24 ч. Ara C $\Rightarrow$ 48 ч. Erufosine] - апоптозните клетки се определят на 40,23%. При клетките, третирани само с антрациклиновия антибиотик Epirubicine, бяха отчетени 20 % апоптозни клетки. В останалите три проби, включително и при нетретирания контрола, 15 % от анализиранияте клетки се намират в субфаза G₁. При сравняване на нетретирания контрола с пробата, инкубирана с Erufosine, са намерени почти еднакви клетъчни фракции във фаза G₀/G₁; сравнително по-малко са клетките в S-фаза и два пъти повече във G₂-фаза след третирането с Erufosine. Приложението на 1,25 μ M Epirubicine най-силно намалява клетките в G₀/G₁-фаза (12 %) и води до по-голямо увеличаване на клетъчната фракция в G₂-фаза (22,94%), в сравнение с нетретирания контрола. Не са отчетени съществени промени в S-фазата спрямо контролата. При комбинацията Epirubicine/Erufosine се отчита намаляване главно на клетките в G₀/G₁ фаза (9,42%), при съпътстващо намаляване на клетъчната фракция в S фаза (25,66%) и изразено увеличаване на клетките в G₂ фаза. Установените промени в разпределението на клетките в клетъчния цикъл, след третиране с комбинацията, имат същия

профил, както при третиране само с Epirubicine, но са по-изразени. Тези данни предполагат наличието на синергизъм в действието на Epirubicine и Erufosine спрямо K-562 клетките.

Въз основа на получените резултати и техния анализ може да се обобщи, че комбинацията, включваща Ara C, реализира апоптоза, която засяга два пъти по-малко клетки, отколкото след третиране само с антиметаболита Ara C. Промените в разпределението на клетките в клетъчния цикъл, след прилагане на комбинацията, са аналогични на тези, настъпили вследствие на самостоятелното третиране на клетките с антиметаболита, но са значително по-слабо изразени. Все пак те са по-значителни от промените, настъпващи след прилагане на комбинацията, включваща атрациклиновия антибиотик Epirubicine, пробата с Erufosine (самостоятелно) и нетретираната контрола. При самостоятелно приложение на Epirubicine и при комбинацията, включваща този цитостатик, се наблюдава увеличение на клетките във фаза G₂, която предхожда фазата на делене M.

Табл. 9. Процент на клетъчните фракции в отделните фази на клетъчния цикъл при левкемичните клетки K-562 след третиране с Erufosine - самостоятелно и в комбинация с цитостатиците Epirubicine или Ara C.

		Процент (%) на клетъчната фракция в отделните фази на клетъчния цикъл				
Клетъчна фаза Третирана проба	M1 (субфаза G ₁ , апоптоза)	M2 (фаза G ₀ /G ₁)	M3 (фаза S)	M4 (фаза G ₂)	Общо всички	
	Нетретирана контрола	15.03	32.64	47.39	7.43	100
	30 μM Erufosine (72 ч.)	15.37	33.06	38.34	14.16	100
	1.25 μM Epirubicine (72 ч)	20.33	12.00	45.70	22.94	100
	1.25 μM Epirubicine (24 ч) ⇒ 30 μM Erufosine (48 ч.)	15.08	9.42	25.66	44.12	100
	40 μM Ara C (72 ч)	88.20	7.95	5.73	0.03	100
	40 μM Ara C (24 ч) ⇒ 30 μM Erufosine (48 ч.)	40.23	24.93	38.58	1.62	100



Фиг. 7. Влияние на алкилфосфохолина Erufosine върху разпределението на левкемичните клетки К-562 в отделните фази на клетъчния цикъл, след самостоятелно приложение и в комбинация с цитостатиците Epirubicine или Ara C. Пиковите свидетелстват за големината на клетъчната фракция в съответната фаза на клетъчния цикъл. **M1** - апоптоза, **M2** - фаза G₀/G₁, **M3** - фаза S, **M4** - фаза G₂.

6. Ефект на Erufosine върху свързването на сигнални молекули с липидните рафтове в клетъчната мембрана

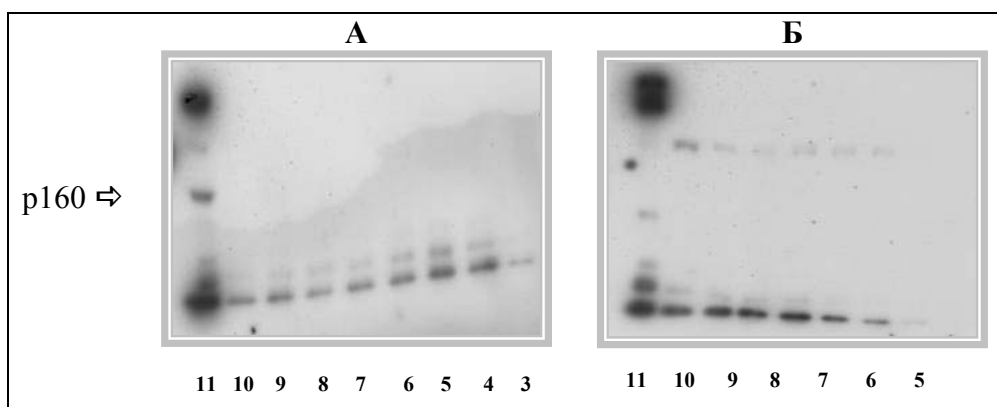
Според литературните данни, важно участие в механизма на действие на етерните липиди имат микродомени, които са разположени в клетъчната мембрана на клетките и са богати на гликосфинголипиди и холестерол. Тези домени са означени като мембранни или липидни рафтове. Предполага се наличието на взаимовръзка между организацията на липидните рафтове и активирането на важни клетъчни протеини, свързани с клетъчната мембрана. Алкилфосфохолинът Erufosine е близък по структура до етерните липиди и поради това структурно сходство, ние изследвахме влиянието му върху свързването на важни сигнални молекули с липидните рафтове в клетъчната мембрана при левкемичните клетъчни линии SKW-3, K-562 и LAMA-84.

Показаните на фиг. 8 имуноблотове свидетелстват за наличието на нискомолекулни фракции на протеина cABL при клетките от левкемичната линия SKW-3, получена от пациент с хронична лимфолевкемия. Локализацията на тези нискомолекулни фракции е в 3-та до 11-та фракция на захарозния градиент. Следи от нефрагментиран cABL се забелязват във фракция 11 от захарозния градиент. След третиране на клетките с 20 μ M Erufosine в продължение на 10 часа, се наблюдава появата на нефрагментиран cABL (160 kDa) във фракции от 5 до 11 на захарозния градиент. Тези резултати са показателни за свързване на АФХ с липидните рафтове след третиране на клетките. Нискомолекулни фрагменти, които се регистрират със същото антитяло при нетретираната контрола, се определят и в третираната проба с локализация във фракциите от 6-та до 11-та, като две ивици една над друга се наблюдават във фракции от 7-ма до 11-та, а във фракциите 3, 4 и 5 те са изчезнали в следствие на третирането.

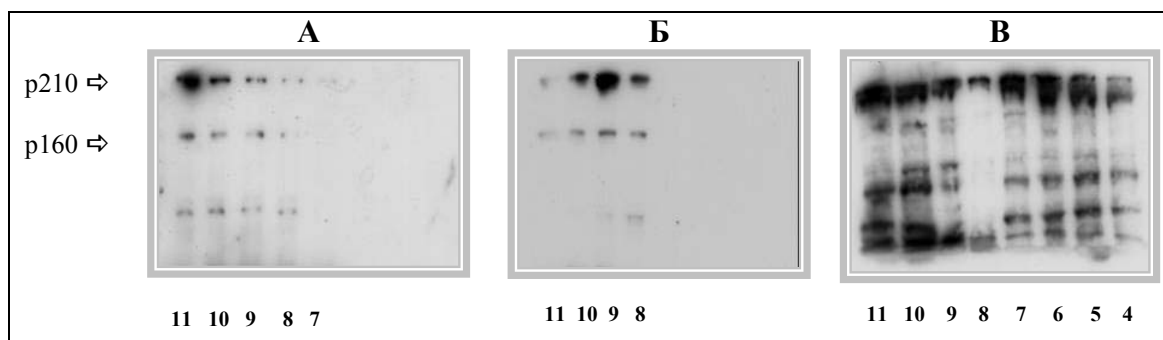
Както е показано на фиг. 9, при нетретираните левкемични K-562 клетки, изолирани от пациент с CML в бластна криза, двата протеина cABL и BCR-ABL са свързани с липидните рафтове във фракциите от 8 до 10 на захарозния градиент. Третирането на клетките с Erufosine в концентрация 20 μ M за 5 часа води до изчезване на ивиците на протеина cABL от фракции 10 и 11 и отчасти от фракция 9. Такъв ефект не се определя за онкопротеина BCR-ABL. Неговото количество се увеличава няколкократно във фракциите 8 и 9, без да изчезва

напълно от фракции 10-та и 11-та. Продължителната инкубация на клетките със същата концентрация Erufosine (24 часа) води до фрагментация на протеини, реагиращи с антитяло за cABL протеина и разпределянето им във всички фракции на захарозния градиент, с изключение на фракция 8.

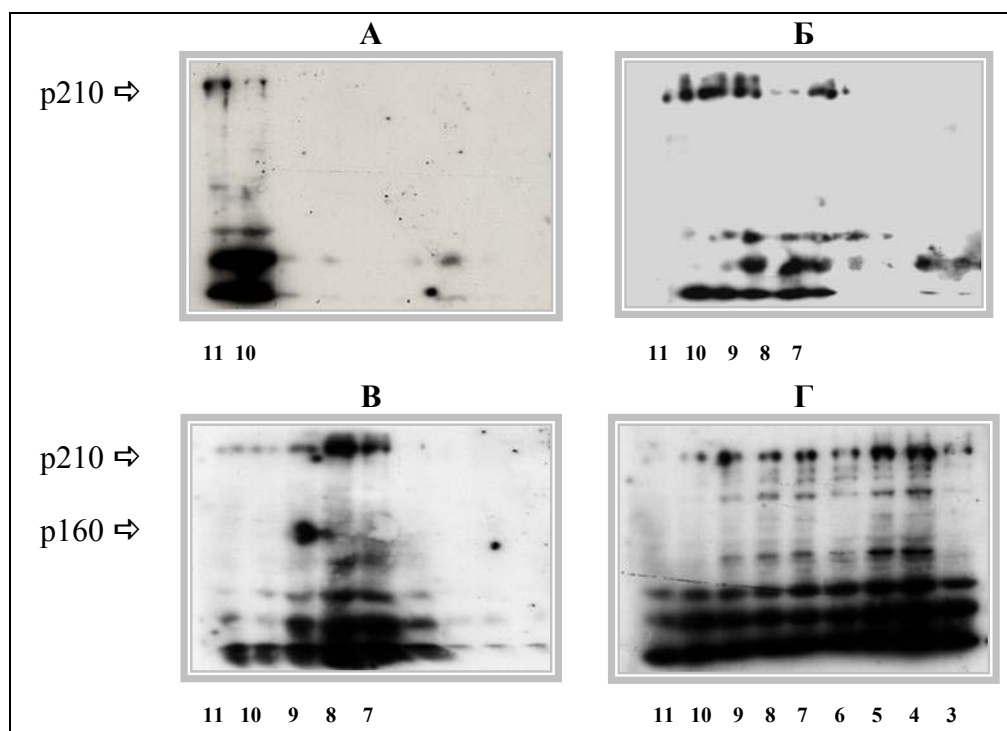
При левкемичните клетки LAMA-84, които са изолирани също като K-562 от пациент с CML в бластна криза, ние не наблюдавахме свързване на протеина cABL с липидните рафтове при нетретираната контрола. Имуноблотите от фиг. 10, проведени с поликлонално антитяло срещу протеините cABL и BCR-ABL, показват, че онкопротеинът BCR-ABL се открива само в две от захарозните фракции на нетретираната контрола - 10-та и 11-та. След третиране на клетките с 30 μ M Erufosine за 15 часа, фузионният онкопротеин се появява и във фракции 7, 8 и 9 на захарозния градиент. След увеличаване на концентрацията на Erufosine до 45 μ M, при същата продължителност на третиране на клетките, не се получават промени в разпределението на двата протеина в липидните фракции. Но при удължаване на експозицията с 30 μ M Erufosine до 24 часа, се появяват ивици на cABL протеина във фракциите от 4-та до 9-та. При същите условия онкопротеинът BCR-ABL изчезва от фракция 11 и се появява във всички останали фракции на захарозния градиент (от 4-та до 10-та).



Фиг. 8 Разпределение на онкопротеина BCR-ABL в липидни фракции от клетъчната мембрана, след въздействие върху SKW-3 клетки с алкилфосфохолина Erufosine. **А** - нетретирана контрола; **Б** - 20 μ M Erufosine, 10 часа; **5 - 11**: фракции от клетъчната мембрана, изолирани чрез ултрацентрофугиране в захарозен градиент и съдържащи липидни рафтове.



Фиг. 9 Разпределение на онкопротеина BCR-ABL в липидни фракции от клетъчната мембрана, след въздействие върху K-562 клетки с алкилфосфохолина Erufosine. **А** - нетретирана контрола; **Б** - 20 μ M Erufosine, 5 часа; **В** - 20 μ M Erufosine, 24 часа; **4 - 11**: фракции от клетъчната мембрана, изолирани чрез ултрацентрофугиране в захарозен градиент и съдържащи липидни рафтове.



Фиг. 10 Разпределение на онкопротеина BCR-ABL (p210) и ABL (p160) в липидни фракции от клетъчната мембрана, след въздействие върху LAMA-84 клетки с алкилфосфохолина Erufosine. **А** - нетретирана контрола; **Б** - 30 μ M Erufosine, 15 часа; **В** - 45 μ M Erufosine, 15 часа; **Г** - 45 μ M Erufosine, 24 часа; **3 - 11**: фракции от клетъчната мембрана, изолирани чрез ултрацентрофугиране в захарозен градиент и съдържащи липидни рафтове.

Може да се обобщи, че Erufosine е мембранно-активно съединение, чиито механизъм на действие е свързан с реорганизацията на липидните рафтове, както и с биохимични промени на някои клетъчни сигнални молекули, чиято активност при предаването на антиапоптозни сигнали зависи от свързването им с клетъчната мембрана. Ние предполагаме, че Erufosine, като представител на АФХ, повлиява взаимодействието между свързаните с клетъчната мембрана сигнални молекули и техните субстрати или пък предизвиква инактивирането им чрез фрагментация.

7. Влияние на Erufosine върху биомолекули от клетъчните сигнални пътища

За изясняване механизма на действие на Erufosine, ние проучихме неговото влияние върху някои клетъчни протеини, участващи в апоптозните сигнални пътища и при осъществяване на програмирана клетъчна смърт. Като тест-системи ние използвахме клетъчните линии от левкемичен произход - K-562, BV-173 и SKW-3. Прилагайки метода Western blot за качествено и полуколичествено определяне на протеиново съдържание в клетъчните лизати (разтвор, включващ всички протеини от цитозола и клетъчното ядро), ние установихме промени в експресията на повечето от включените в изследването протеини.

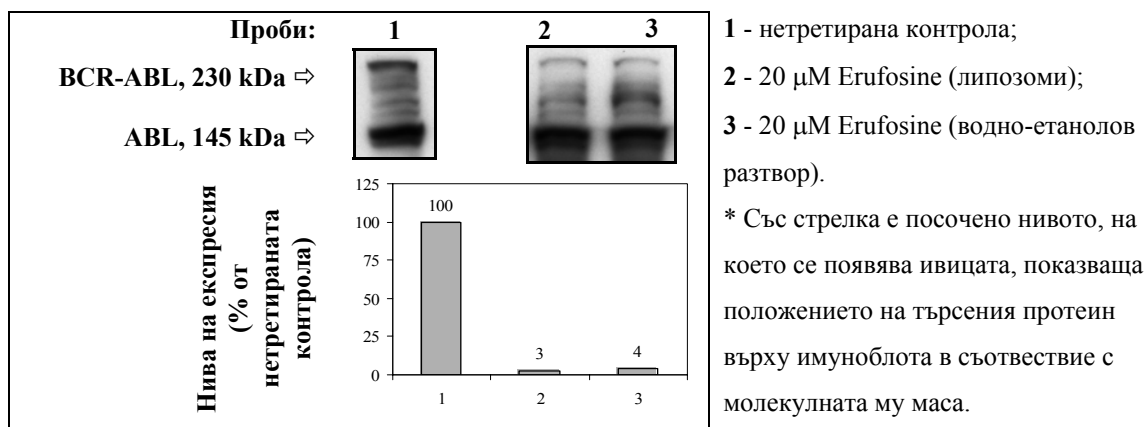
7.1. Ефект на Erufosine върху експресията на онкопротеина BCR-ABL в левкемичната клетъчна линия K-562.

Фузионният онкопротеин BCR-ABL има основно значение за патологичните промени в клетъчните сигнални пътища при хроничната миелогенна левкемия (CML), водещи до засилена бластна пролиферация на хемопоетичните клетки. Злокачествено трансформираната клетъчна линия K-562, която експресира във високи количества BCR-ABL (p210, с молекулна маса 210 kDa) беше третирана с 20 μ M водно-етанолов или липозомен разтвор на Erufosine за период от 72 ч.

Както се вижда от фиг. 11, количеството на BCR-ABL в нетретираната контрола е по-високо от това в третираните клетки - хемилуминесцентното изображение на електрофоретичните ивици на протеина, свързан с

разпознаващите го антитела, е по-плътно и по-голямо при контролата в сравнение с третираните проби. След третирането на клетките с Erufosine като водно-етанолов разтвор или липозоми, се отчита намаляването на нивото на протеина BCR-ABL до 3-4 %, което свидетелства за инхибиране на експресията му в присъствието на алкилфосфохолина. Като “вътрешна” контрола, доказваща еднаквото протеиново съдържание в сравняваните проби, послужи експресионното ниво на киназата ABL (145 kDa), която се разпознава от същото антитяло, както и BCR-ABL, но за разлика от последния не се повлиява при третиране с Erufosine. Плътността на протеиновите ивици е определена с помощта на програмата AdobePhotoshop 7, а данните от денситометричния анализ, представени на графиката под имуноблота, отразяват количествено намалената експресия на BCR-ABL (до 4 % при водно-етаноловия разтвор и до 3% при лимозомната форма).

Получените данни показват, че алкилфосфохолинът Erufosine повлиява експресията на онкопротеина BCR-ABL, като я намалява до 3-4 % след приложение на разтвор с концентрация 20 μ M.



Фиг. 11. Имуноблот с поликлонално антитяло срещу BCR и BCR-ABL в левкемичната клетъчна линия K-562, след въздействие с 20 μ M Erufosine (под формата на разтвор или липозоми) за период от 72 ч.

7.2. Ефект на Erufosine върху експресията на ретинобластомния протеин Rb в левкемични клетъчни линии, експресиращи онкопротеина BCR-ABL.

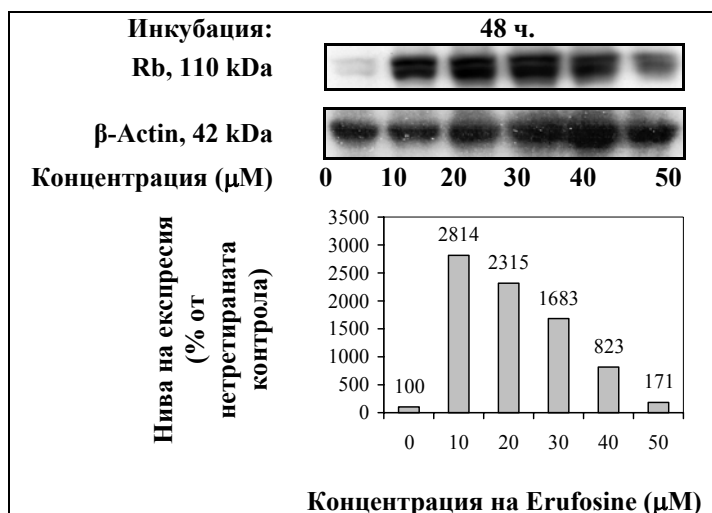
Ретинобластомният протеин pRb има важно участие в регулацията на клетъчния цикъл. В хипофосфорилирано състояние той спира преминаването на клетките от фаза G1 във фаза М през т.нар. рестрикционна точка R чрез свързване и инхибиране на транскрипционните фактори от фамилията E2F.

Известно е, че разграждането на Rb-протеина от каспазите е етап от апоптозата, но загубата на Rb в условията на компрометирана клетъчна смърт, вследствие на увреждане на апоптозните пътища, може само да допринесе за туморния растеж.

Клетъчната линия K-562 беше третирана в продължение на 48 ч. с пет различни концентрации на Erufosine - 10, 20, 30, 40 и 50 μM (фиг. 12). Резултатите от тези изследвания показват, че нивото на експресия на Rb протеина е обратно пропорционално на концентрацията на Erufosine, т.е. най-голяма стимулация на Rb-експресията се наблюдава при най-ниските приложени концентрации - 10, 20 и 30 μM . Третирането на клетките с тези концентрации води до засилване на експресията на ретинобластомния протеин. Данните от денситометричния анализ показват, че най-големи количества от него се определят в клетъчните лизати, третирани с 10 μM Erufosine, където плътността на Rb-ивицата нараства почти 30 пъти (2814%) спрямо контролата. При 20 μM Erufosine е установена плътност на ивицата 2315% спрямо контролата. При 30 и 40 μM нивото на експресия намалява съответно до 1683% и 823%. С повишаване на концентрацията до 50 μM се наблюдава намаляване на нивото на Rb до 171% и то се доближава до това в нетретиранта контрола.

Като вътрешна контрола за доказване на еднаквото протеиново съдържание в изследваните лизати, беше използвано нивото на убиквитерния клетъчен протеин β -Actin. Чрез направения денситометричен анализ е определено точното съотношение между плътността на ивиците на Rb спрямо плътността на ивиците на контролния протеин β -Actin. След нормализиране спрямо β -Actin е определено нивото на експресия на ретинобластомния протеин в проценти.

Обобщените резултати от тези изследвания свидетелстват за влиянието на алкилфосфохолина Erufosine върху експресията на регулатора на клетъчния цикъл Rb. Повишаването на клетъчното ниво на последния, като резултат от третирането с ниски концентрации Erufosine, доказва индуциращото действие на алкилфосфохолина върху Rb-протеина, с което може да се промени регулацията на клетъчния цикъл в туморните клетки.



Фиг. 12 Имуноблот с моноклонално антитяло срещу Rb при K-562 клетки, след третиране с Erufosine. Диаграмата представя резултатите от денситометричния анализ.

7.3. Промени в експресията на протеинкиназа В (активна фосфорилирана и неактивна нефосфорилирана форма) при K-562 клетки след третиране с Erufosine.

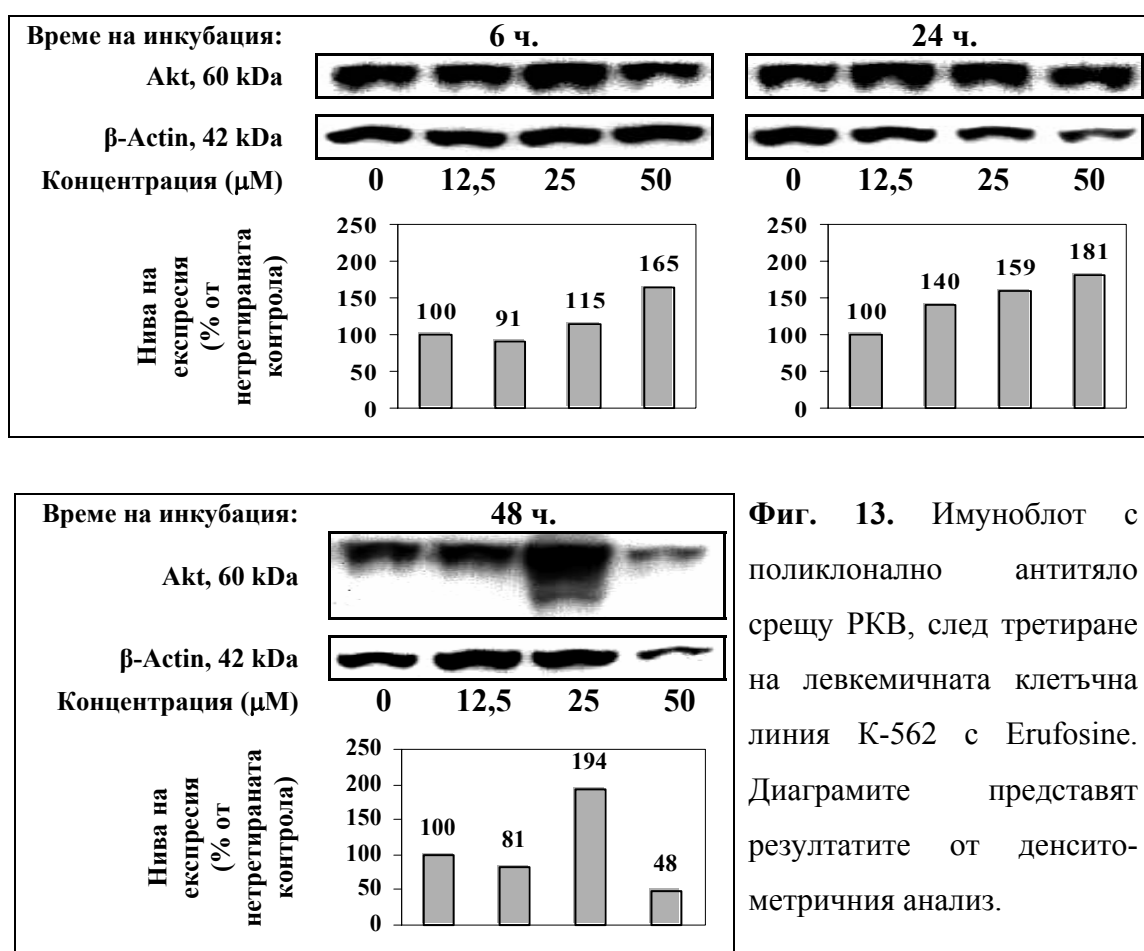
При тези експерименти ние проследихме влиянието на Erufosine върху експресията на протеин киназа В (РКВ, Akt) в клетъчната линия K-562. Първоначално беше установено влиянието на алкилфосфохолина върху общата експресия на изследвания протеин. Клетките бяха третирани с три концентрации Erufosine - 12.5, 25 и 50 μM за време от 6, 24 и 48 ч. (фиг. 13). Установено беше, че през първите 24 ч от третирането се наблюдава характерно нарастване на разпознатото от специфичното антитяло количество на ензима при всичките приложени концентрации. Нивото на ензима съставлява 140-181% от контролата. На 48-ия час тази тенденция за повишаване се запазва само при концентрацията 25 μM (до 194% спрямо нетретираната контрола). В останалите две проби, третирани с 12,5 и 50 μM, се доказват по ниски нива на РКВ - съответно 91% и 48% от нетретираната контрола.

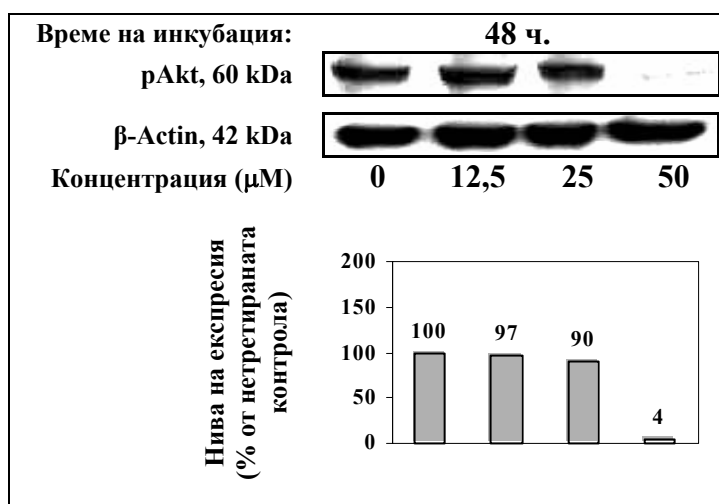
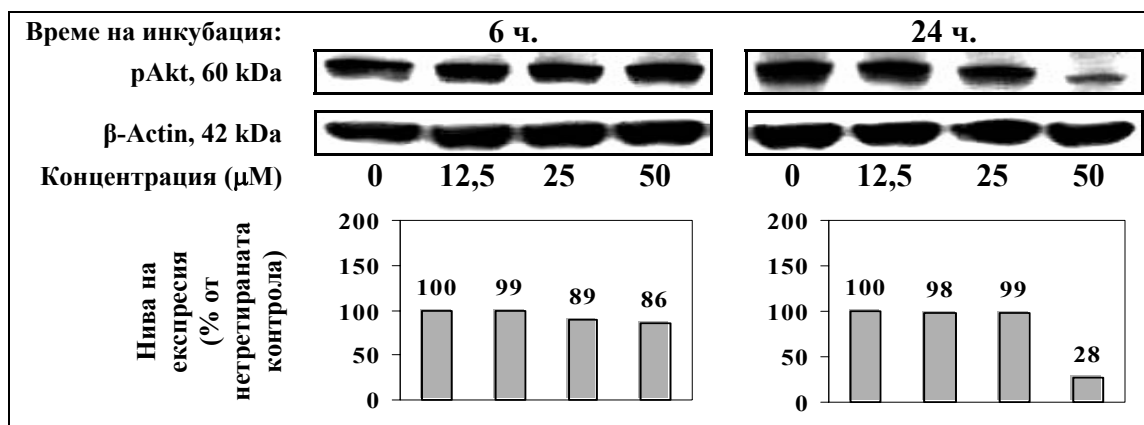
Данните за промените в нивото на активната фосфорилирана форма на РКВ (pAkt) са представени на фиг. 14. В първите 6 часа след третирането се наблюдава слабо намаляване на експресията при две от концентрациите - 25 и 50 μM. След 24 ч. инкубиране, нивото на фосфорилираната РКВ продължава да намалява в пробата, третирана с най-високата концентрация Erufosine (50 μM) и достига до 28 % спрямо нетретираната контрола. След 48-ия час се установяват само следи от Rb-протеина в пробата, третирана с 50 μM Erufosine - според

денситометричния анализ количеството му е едва 4% от нетретираната контрола.

Като вътрешна контрола за равномерното нанасяне на пробите в гела е използвано количеството на убиквитерния протеин β -Actin. Съотношението между Akt и pAkt в пробите е изчислено в проценти след денситометричен анализ.

Получените данни показват, че Erufosine инхибира експресията на активната протеин киназа В и този ефект е по-силно изразен при по-високите концентрации и при по-голяма продължителност на експозицията.





Фиг. 14. Имуноблот с поликлонално антитяло срещу РКВ, фосфорилиран при Thr 308, след третиране на левкемичната клетъчна линия K-562 с Erufosine. Диаграмите представят резултатите от денситометричния анализ.

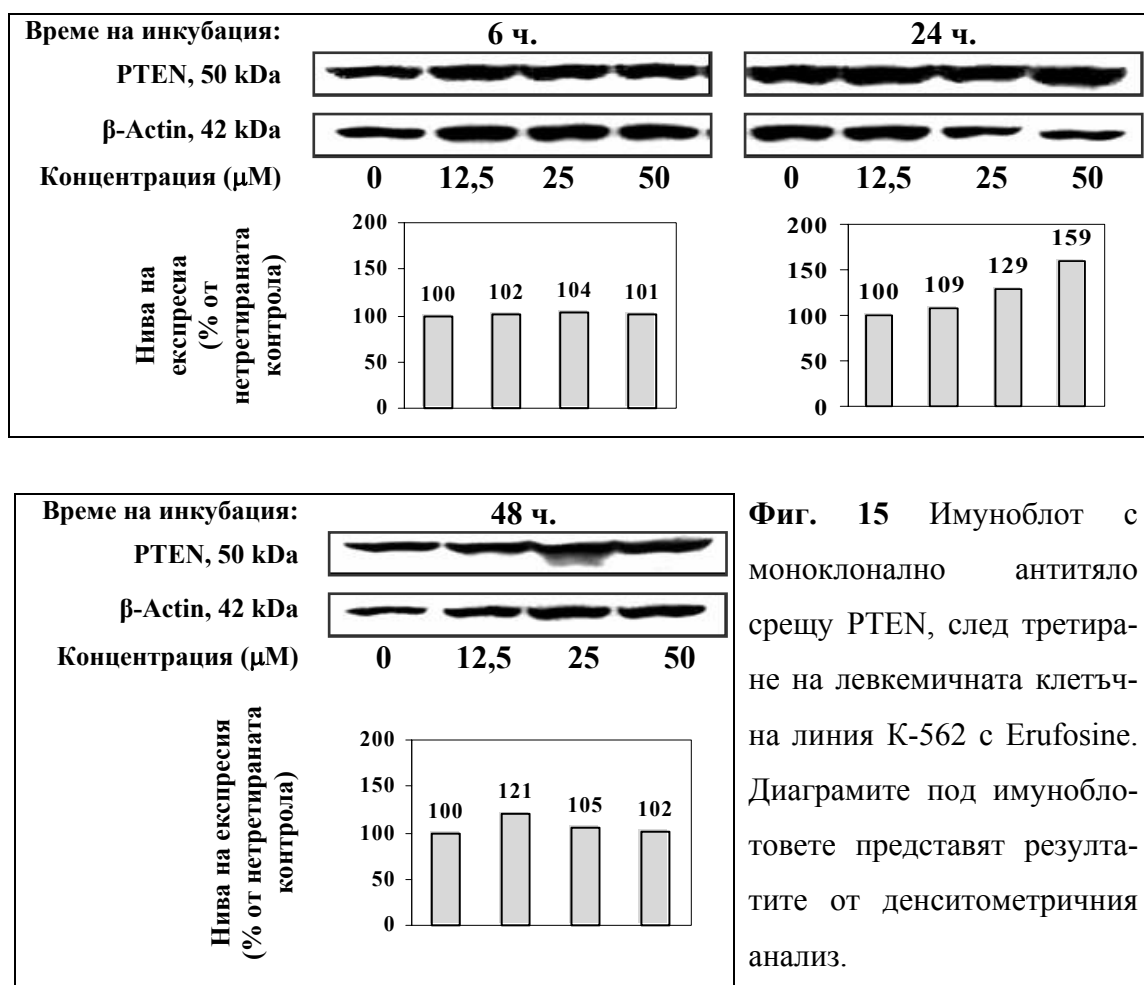
7.4. Ефект на Erufosine върху експресията на протеина PTEN в левкемичната клетъчна линия K-562 (СМЛ в миелобластна криза).

Данните от тези проучвания са представени на фиг. 15. K-562 клетките бяха изследвани за установяване на клетъчното ниво на туморно-супресорната инозитолфосфолипидна фосфатаза PTEN. Установено беше, че след 6-часова инкубация на левкемичните клетки с 12.5, 25 или 50 μ M Erufosine нивото на експресия на PTEN е почти същото, както в контролната проба. След 24-часово третиране експресията на туморно-супресорния протеин се усилва в правопроеционална зависимост от приложената концентрация. Най-високо ниво на PTEN (160%) се отчита в пробата, инкубирана с 50 μ M Erufosine. Нивото на експресия при 12.5 μ M и 25 μ M Erufosine е съотв. 109% и 129%. На 48^{-ия} час тенденцията за нарастване на количеството на PTEN, под влияние на Erufosine, се запазва само при най-ниската приложена концентрация (12.5 μ M) - нивото на протеина е 121%. При концентрациите 25 или 50 μ M количеството на PTEN

отново спада до това, отчетено в нетретираната контрола и прието за 100% след извършването на денситометричен анализ.

Изчисленията на експресията на протеина PTEN са направени с денситометричен анализ на протеиновите ивици с програмата Adobe PhotoShop 7.0 и нормализация на плътността на ивиците за PTEN спрямо убиквитерния цитоскелетен протеин β -Actin, приет за вътрешна контрола.

Получените при този експеримент резултати показват, че алкилфосфохолинът Erufosine причинява засилване на експресията на туморно-супресорния протеин PTEN по концентрационно-зависим начин, единствено след период на третиране от 24 часа. При най-ниската приложена концентрация (12.5 μ M), степента на експресия зависи от продължителността на третирането, поради което увеличено ниво на изследвания протеин се наблюдава след 48-часова инкубация с Erufosine.



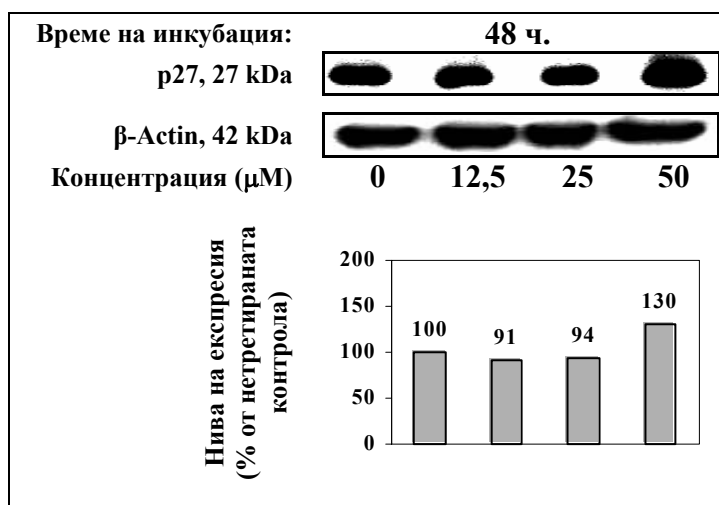
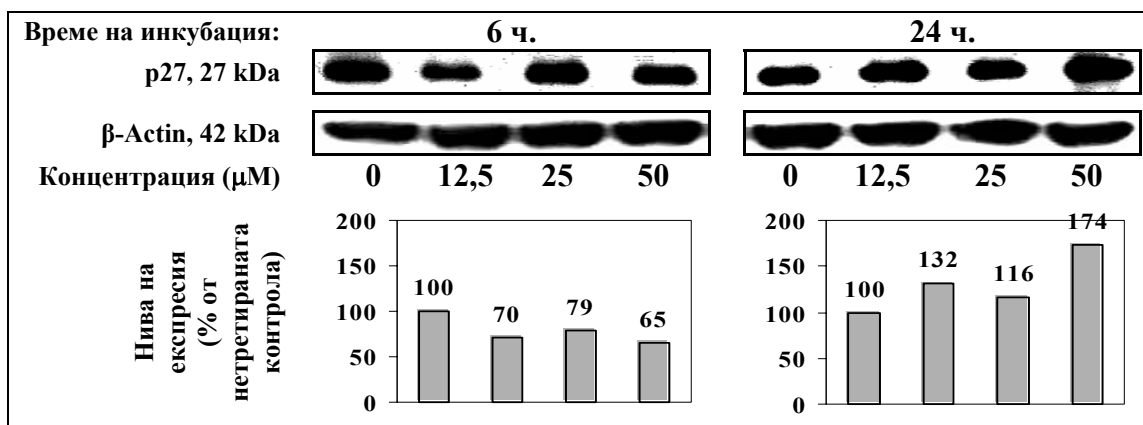
7.5. Ефект на Erufosine върху експресията на протеина p27 в K-562 клетки, експресиращи онкопротеина BCR-ABL.

Cdk-инхибиращият протеин (CKI) p27 е един от протеините, чрез които се осъществява предаването на клетъчни сигнали от PIP3-пътища и от протеин киназа В към ретинобластомния протеин Rb.

За да установим влиянието на алкилфосфохолина Erufosine върху p27, ние третирахме левкемичната клетъчна линия K-562 с различни концентрации Erufosine в продължение на 6 до 48 ч. Клетките бяха инкубирани с 12.5, 25 или 50 μM Erufosine. На 6^{-ия}, 24^{-ия} и 48^{-ия} час от началото на третирането, от клетките бяха изолирани проби, които бяха изследвани за степента на експресия на p27 с помощта на имуноблот (фиг. 16). През първите 6 часа не се определят промени в нивото на p27 в сравнение с третираната контрола. На 24^{-ия} час се наблюдава засилване на експресията на протеина и при трите използвани концентрации. Най-високо ниво на p27 протеина (174% спрямо контролата) се установява в пробата, третирана с най-високата концентрация Erufosine (50 μM). В останалите две проби експресията на p27 е 132% и 116% съответно за концентрациите 12,5 μM и 25 μM . При концентрация от 50 μM клетъчното ниво на p27 се запазва до 48^{-ия} час по-високо от това в контролата (130%), докато в другите две проби, при 12.5 μM и 25 μM Erufosine, се доказва намаляване на експресията на протеина съответно до 91% и 94%.

Като вътрешна контрола за равномерно нанасяне на пробите в полиакриламидния гел и равномерно протеиново съдържание беше определено количеството на структурно-клетъчния протеин β -Actin. Сравнение между нивата на p27 в отделните проби в проценти беше направено след денситометричен анализ на протеиновите ивици с програмата Adobe PhotoShop 7.0 и нормализация на нивата на p27 спрямо контролния протеин β -Actin.

Резултатите от тези изследвания могат да се анализират спрямо данните, получени за експресията на РКВ/АКТ при клетъчната линия K-562. Установена е ясна корелация между експресията на p27-протеина и нивото на активната протеин киназа В. Нивото на p27 е увеличено в случаите, когато нивото на pAkt е намалено. Тези данни свидетелстват за потискане на образуването на активни комплекси между циклините и циклин-зависимите кинази.



Фиг. 16. Имуноблот с поликлонално антитяло срещу p27, след третиране на левкемичната клетъчна линия K-562 с Erufosine. Диаграмите под имуноблотите представят резултатите от денситометричния анализ.

7.6. Ефект на Erufosine върху експресията на протеина Bad в левкемичната клетъчна линия K-562.

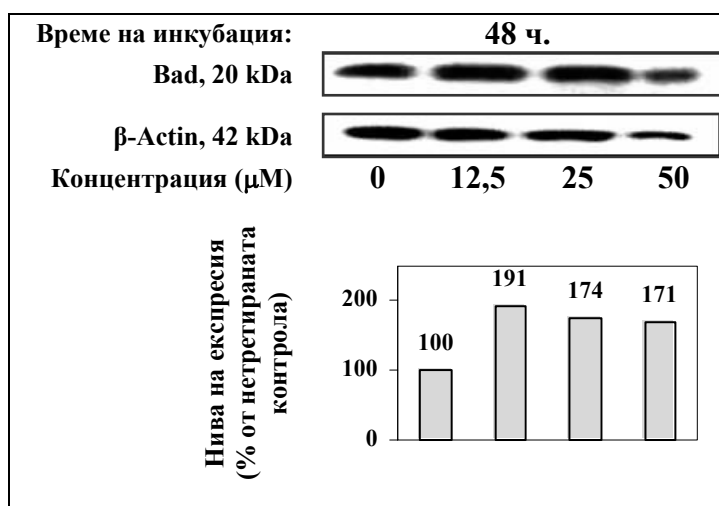
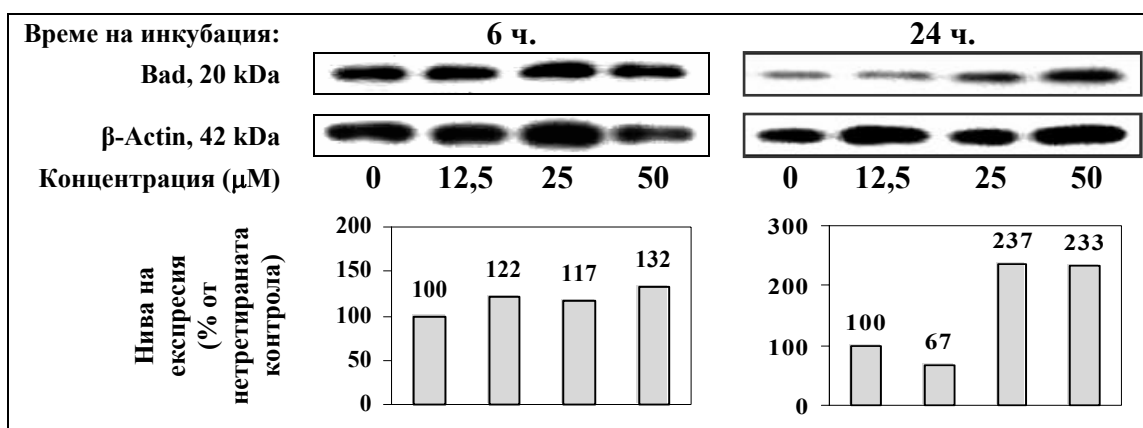
Левкемичните миелоидни клетки K-562 бяха третирани с три различни концентрации Erufosine (от 12.5 до 50 μ M) в продължение на 6, 24 и 48 ч. Както се вижда от резултатите, представени на фиг. 17, след 6-часово третиране на клетките нивото на експресия на апоптозния протеин Bad се повишава и в трите проби, т. е. при всички приложени концентрации на Erufosine. Повишението е сходно по степен на изразеност при отделните концентрации - 122 %, 117 % и 132 % съответно за 12,5 μ M, 25 μ M и 50 μ M. При анализа на пробите, изолирани след 24-ова инкубация, се отчита двукратно нарастване на количеството на Bad спрямо нетретираната контрола до 237% и 233% при клетките, третирани съотв. с 25 и 50 μ M Erufosine. При пробата, подложена на въздействието на най-ниската концентрация (12,5 μ M), се определя намалено ниво на протеина до 67%. При отчитане на нивото на експресия на протеина на 48-ия час от началото на третирането с Erufosine, се наблюдават отново по-високи нива на протеина

Проучване върху фармакодинамичните ефекти на Erufosine при туморно-трансформирани и нормални хемопоетични клетки

спрямо контролата при всички концентрации. След прилагане на концентрация 12,5 μM е налице повишаване на експресията на Bad до 191%, в сравнение с установеното след 24-ия час при същата концентрация. При концентрациите 25 μM и 50 μM количеството на изследвания протеин съставя съответно 174 % и 171 % спрямо контролата.

Нивото на Bad във всяка една проба е изчислено в проценти спрямо нетретираната контрола, след денситометричен анализ на протеиновите ивици с програмата Adobe PhotoShop 7.0 и нормализация на нивото на експресия на Bad спрямо убиквитерния цитоскелетен протеин β -Actin.

Получените резултати показват, че алкилфосфохолинът Erufosine индуцира експресията на антиапоптозния протеин Bad в приложените концентрации от 25 до 50 μM и този ефект не зависи от продължителността на експозицията. Експресията на протеина е изразена в различна степен, в зависимост от периода на инкубиране с Erufosine и е най-висока след 6-часова и 48-часова експозиция.



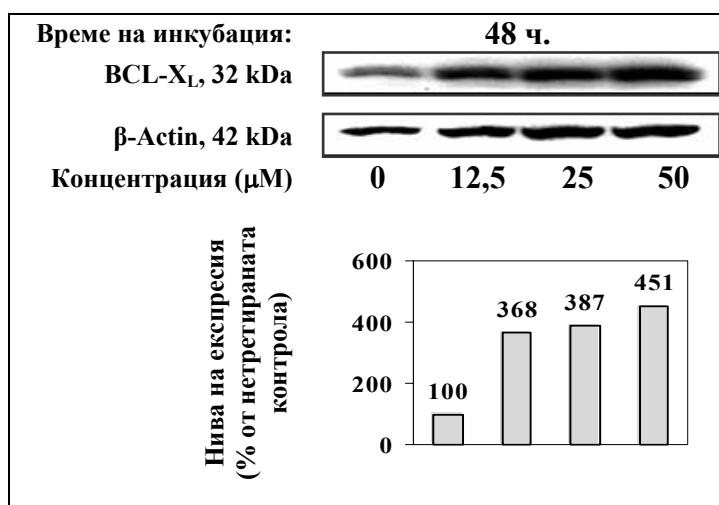
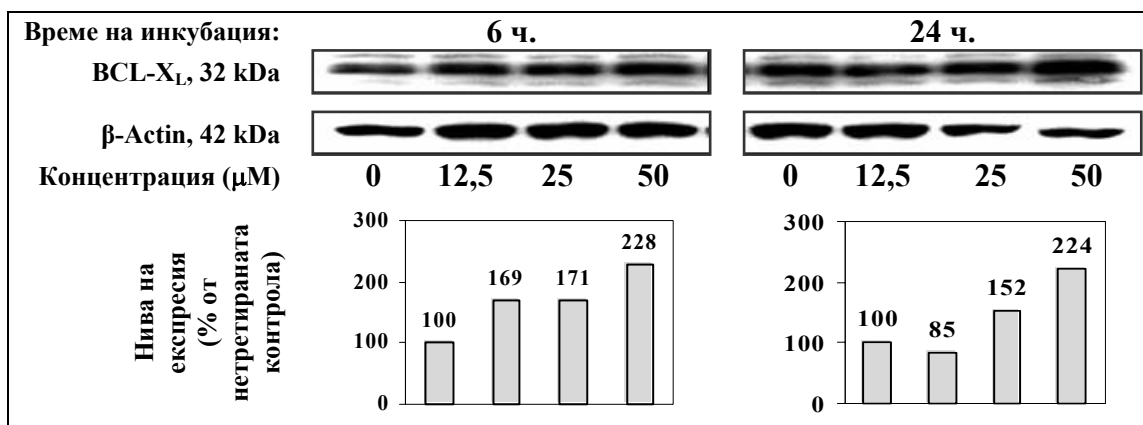
Фиг. 17 Имуноблот с моноклонално антитяло срещу Bad, след третиране на левкемичната клетъчна линия K-562 с Erufosine. Диаграмите под имуноблотовете представят резултатите от денситометричния анализ.

7.7. Ефект на Erufosine върху експресията на протеина BCL-X_L в левкемичната клетъчна линия K-562.

Протеинът BCL-X_L е известен като антиапоптозен протеин, който инхибира сигналите за програмирана клетъчна смърт. В нашите изследвания беше проследено влиянието на Erufosine върху неговата експресия. Левкемичните клетки K-562 бяха третирани с алкилфосфохолина Erufosine в три различни концентрации (от 12.5 до 50 μ M) в продължение на 6, 24 и 48 ч. От резултатите, представени на фиг. 18, се вижда засилване на експресията на BCL-X_L още в първите 6 часа от третирането на клетките. Плътноста на протеиновите ивици се изчислява след денситометричен анализ на 16% и 171% при концентрациите 12.5 μ M и 25 μ M. При най-високата концентрация от 50 μ M се отчита най-високо ниво на инхибиторния протеин - 228% от нетретираната контрола. Повишеното ниво на експресия след третирането с Erufosine се запазва и след експозиция в продължение на 24 часа. При пробите, изолирани на 24^{-ия} час, се установява увеличаване на количеството на BCL-X_L до 152% и 224% при клетките, инкубирани съответно с 25 μ M и 50 μ M. При най-ниската концентрация (12.5 μ M) се отчита слабо намаляване на нивото на протеина - до 85% спрямо нетретираната контрола. След 48-часова инкубация нивото на BCL-X_L в пробите, третирани с 12.5 μ M и 25 μ M, се повишава до три пъти спрямо контролата и достига съответно до 368% и 387%. При концентрация от 50 μ M Erufosine експресията на протеина достига най-високо ниво - до 451% в сравнение с контролата.

Нивото на експресия на апоптотичния инхибитор BCL-X_L беше изчислено в проценти спрямо контролата с помощта на денситометричен анализ с програмата Adobe PhotoShop 7.0. Като вътрешна контрола за нормализация на количеството на протеините в клетъчните проби беше използвано нивото на убиквитерния протеин β -Actin.

Получените резултати за промените в експресията на антиапоптозния протеин BCL-X_L в K-562 клетки показват, че вследствие на третирането с Erufosine, нивото на протеина се повишава правопрпорционално на приложената концентрация и времето на експозиция. Най-висока експресия се отчита при най-продължителна експозиция на третиране и при най-висока концентрация на Erufosine.



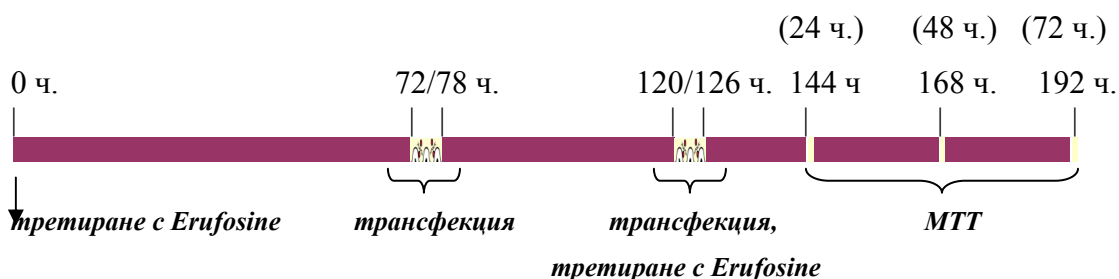
Фиг. 18 Имуноблот с поликлонално анти тяло срещу протеина Bcl-xL след третиране на левкемичната клетъчна линия K-562 с Erufosine. Диаграмите под имуноблотите представят резултатите от денситометричния анализ.

8. Разработване на модел на левкемични клетки с преходно намалена експресия на ретинобластомния протеин Rb и определяне на влиянието на Erufosine върху виталността и Rb-експресията на клетките

За получаването на модел на левкемични клетки с преходно потисната експресия на ретинобластомния протеин Rb бяха използвани BV-173 клетки, с произход от CML. Те бяха трансфектирани с два антисенс-олигонуклеотида (ASO) с различна нуклеотидна последователност, които са насочени срещу определени участъци от иРНК на протеина Rb. Хибридизацията на ASO с Rb-иРНК води до нейното ензимно разграждане и до намалено ниво на Rb-протеина в трансфектираните клетки. След доказване на ефективността на двата вида ASO, трансфектираните клетки бяха третирани с Erufosine. Виталността на BV-173 беше определена с МТТ-тест и беше проследено влиянието на Erufosine върху клетъчното ниво на Rb-протеина в условията на потисната Rb-експресия.

8.1. Виталност на BV-173 клетки с намалена Rb-експресия след третиране с Erufosine .

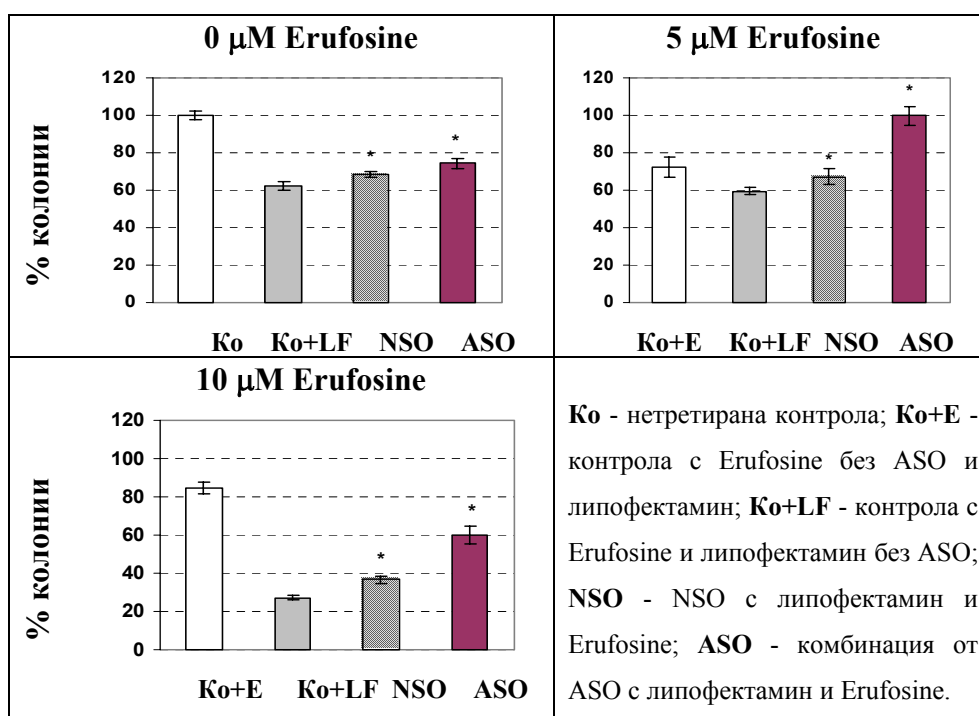
Влиянието на алкилфосфохолина Erufosine върху виталността на BV-173 клетките, в условията на преходно Rb-потискане, беше проследено при три различни концентрации. BV-173 бяха първоначално третирани с 5 до 20 μM за период от 72 часа. След двукратна трансфекция с два ASO през 48 часа (първо с ASO A и после с ASO B), клетките бяха повторно третирани с Erufosine, както е показано на схемата. Виталността на клетките беше отчетена посредством MTT-тест на 144-ия, 168-ия и 192-ия час от началото на експеримента.



Резултатите от тези изследвания са представени на фиг. 19. След 48 часа инкубиране с 5 μM Erufosine, количеството на виталните клетки, изразено като процент от нетретирания контрол, в условията на преходно Rb-потискане, е по-голямо от това на клетките със запазено ниво на протеина Rb и третирани със същата концентрация (Ko+E и NSO). Тяхната виталност не се различава достоверно от тази на нетретиранияте клетки. При двете по-високи концентрации Erufosine - 10 и 20 μM - се отчита намален брой витални клетки с преходна Rb-инхибиция, в сравнение с т.нар. wild type (WT) клетки. При концентрация от 10 μM Erufosine фракцията на виталните WT-клетки е над 80%, докато клетките с Rb-потискане съставят 60% от нетретирания контрол. При 20 μM Erufosine процентът на виталните клетки и в двете групи е еднакъв и се определя на 20%.

Въз основа на получените резултати може да се обобщи, че цитотоксичният ефект на Erufosine върху клетки с потисната експресия на Rb-протеина (индуцирана от ASO) зависи от приложената концентрация. Ниската концентрация на Erufosine (5 μM) не повлиява виталността на третиранияте клетки. С увеличаване на концентрацията до 20 μM се постига цитотоксичност при клетките с преходно инхибиране на Rb-експресията и не се отчита разлика във виталността на трансфектираните с ASO клетки и клетките с нормална експресия на Rb. Освен това, клетките, трансфектирани с NSO са по-

чувствителни към действието на Erufosine от тези, трансфектирани с ASO и това се наблюдава при всички приложени концентрации.



Фиг. 19 Виталност на BV-173 клетките с преходно намалена експресия на Rb-протеин след 48 ч. третиране с различна концентрация Erufosine. Стойностите във всяка графика, между които има статистически значима разлика ($p < 0.05$), са отбелязани с еднакви символи над стълбчетата.

8.2. Влияние на Erufosine върху експресията на протеина Rb при BV-173 клетки в условията на преходно Rb - потискане.

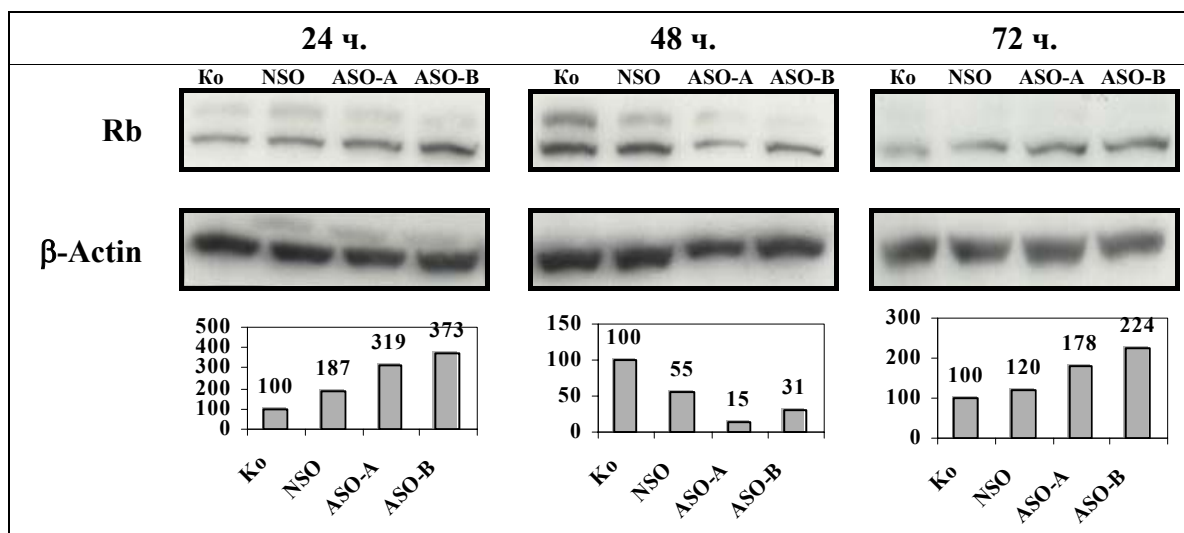
8.2.1. Експресия на протеина Rb след преходно Rb-потискане в BV-173 клетки с комбинации от ASO.

Клетките от клетъчната линия BV-173 бяха трансфектирани с ASO и инкубирани за периоди от 24, 48 и 72 ч. В края на всеки инкубационен период бяха изпитани проби за оценка на степента на експресия на протеините Rb и p53 чрез метода имуноблот. Последователността на провеждане на отделните етапи от експеримента е представена на следната схема:



Резултатите, представени на фиг. 20, показват трикратно увеличение на експресията на Rb на 24-ия часа след трансфекция с ASO A или ASO B. Този ефект е съпроводен от намаляване на клетъчното ниво на туморно-супресорния протеин p53. Експресията на Rb-протеина достига до 319% след трансфекция с ASO A и до 373% - след ASO B. В пробите, обработени с NSO, експресията на Rb се увеличава до 187% спрямо контролата. На 48-ия час от трансфекцията нивото на Rb в клетките, трансфектирани с ASO A или ASO B, спада рязко - съответно до 15% и 31% в сравнение с нетрансфектираната контрола. При трансфекцията с NSO е определено повишаване на Rb-експресията след 48 часа с 45% спрямо контролата. На 72-ия час от началото на трансфекцията, нивото на Rb протеина отново се възстановява и достига стойности, достоверно по-високи от тези на нетрансфектираната контрола. Експресията на Rb в пробата с NSO възлиза на 120%, докато при клетките, трансфектирани с ASO A и ASO B - съотв. 178 % и 224 %.

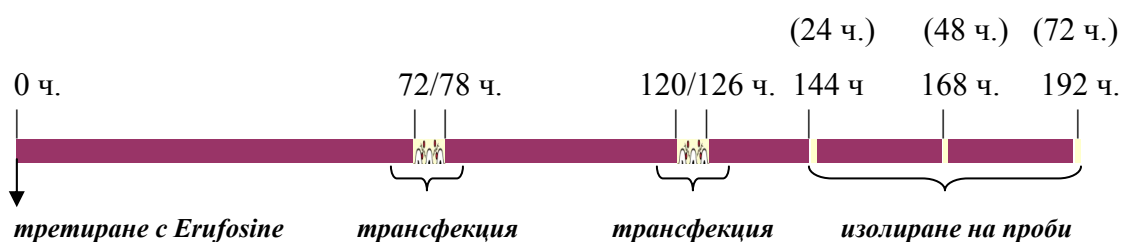
Получените резултати показват, че трансфекцията на антисенс-олигонуклеотидите ASO A и ASO B след трансфекция в клетки BV-173, причинява намаляване на Rb-експресията на 48-ия час след процедурата. Постига се преходен дефицит на протеина Rb.



Фиг. 20 Имуноблот с моноклонално антитяло срещу Rb-протеин при левкемичните клетки BV-173, трансфектирани еднократно с NSO и с комбинациите ASO A или ASO B. Под имуноблота са представени графики с резултатите от денситометричното определяне на интензитета на бандовете след нормализация спрямо убиквитерния протеин β -Actin.

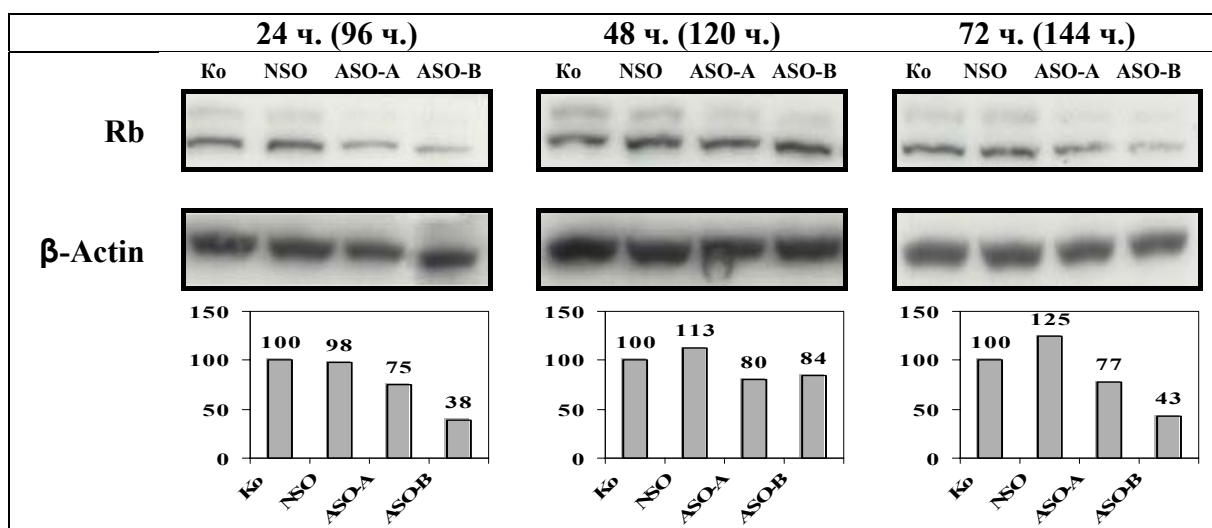
8.2.2. Експресия на Rb-протеина след третиране на BV-173 клетките с 5 μ M Erufosine в условията на преходно Rb-потискане.

Целта на това проучване беше да се определи влиянието на Erufosine върху експресията на ретинобластомния протеин Rb в клетки с преходно намалена експресия на Rb, които са били третирани с 5 μ M Erufosine 72 часа преди първата трансфекция. След двукратна трансфекция на клетките с ASO А или ASO В в рамките на 48 часа, бяха взети проби за имуноблот на 144-ия, 186-ия и 192-ия час от началото на експеримента, както е посочено на следната схема:



Получените от имуноблота резултати са представени на фиг. 21. Определено е намаляване на Rb-протеина след първите 24 часа от трансфекцията - до 38% в пробата с ASO В и до 75% - с ASO А. При същите клетки на 48-ия час се наблюдава относително усилване на експресията на ретинобластомния протеин (до 84%), което се последва от ново намаление на експресията на 72-ия час при клетките, трансфектирани с ASO В – до 43 %. При трансфекция с ASO А промени в експресията на Rb не се наблюдават в периода между 24-ия и 72-ия час. Нивото на ретинобластомния протеин се определя на 75%, 80% и 77% съответно на 24-ия, 48-ия и 96-ия час от трансфекцията.

Резултатите, получени при този експеримент показват, че при трансфекция на K-562 и BV-173 клетките с комплекси между ASO и Lipofectamin[®] се постига сравнително кратка продължителност на Rb-потискането. Заедно с това, предварителното третиране с Erufosine повлиява действието на антисенс-олигонуклеотидите. След 24-ия час и 72-ия час от трансфекцията нивото на ретинобластомния протеин Rb е по-ниско от това в клетките, които са трансфектирани с ASO и нямат предварително третиране с Erufosine.



Фиг. 21 Имуноблот с моноклонално анти тяло срещу Rb при левкемичните клетки BV-173, предварително третирани с 5 μ M Erufosine и трансфектирани двукратно с комбинациите ASO A или ASO B. Под имуноблота са представени графики с резултатите от денситометричното определяне на интензитета на бандовете след нормализация спрямо убиквитерния протеин β -Actin.

9. Разработване на модел на SKW-3 клетки със стабилно намалена Rb-експресия и определяне на влиянието на Erufosine върху виталността на клетките

С оглед постигане на по-продължителна стабилно намалена Rb-експресия в клетките, ние разработихме модел на левкемичната клетъчна линия SKW-3, трансфектирана с лентивирусния вектор LentiLox 3.7 (pLL3.7). Този вектор експресира къса двойноверижна РНК с еднoверижна бримка (hpRNA), клонирана от нас в хода на експеримента, която предизвиква намаляване на експресията на Rb-протеина чрез РНК-интерференция. За тази цел ние използвахме два РНК-олигонуклеотида, взаимодействащи с определен участък от иРНК на Rb-протеина. Дължината на единия РНК-олигонуклеотид е 21 bp, а на другия - 27 bp, т.е. комплементарният участък е с 6 рибонуклеотидни двойки по-дълъг. Така разликата между двете РНК-последователности се изразява само в дължината им, но не и в мястото на свързване с прицелната иРНК. С тази трансфекция ние постигнахме продължително намаляване на нивото на Rb-протеина, позволяващо инкубирането на трансформираните клетки с Erufosine за периоди от време с различна продължителност.

Клетъчната линия SKW-3 беше трансфектирана със следните три вирусни плаزمиди, създадени от нас в хода на експерименталната работа:

- контролен плазмид *pLL 3.7*, който експресира *EGFP-протеин* и *неутрална РНК-последователност (CMV-Co)*;
- плазмид *pLL 3.7*, експресиращ *EGFP-протеин* и *hpRNA* с комплементарност към човешката *Rb-иРНК* и дължина на комплементарния *РНК-фрагмент 21 bp (pLL H1-21)*;
- плазмид *pLL 3.7*, който експресира *едновременно EGFP-протеин* и *hpRNA* с комплементарност към човешката *RB-иРНК* и дължина на комплементарния *РНК-фрагмент 27 bp (pLL H1-27)*.

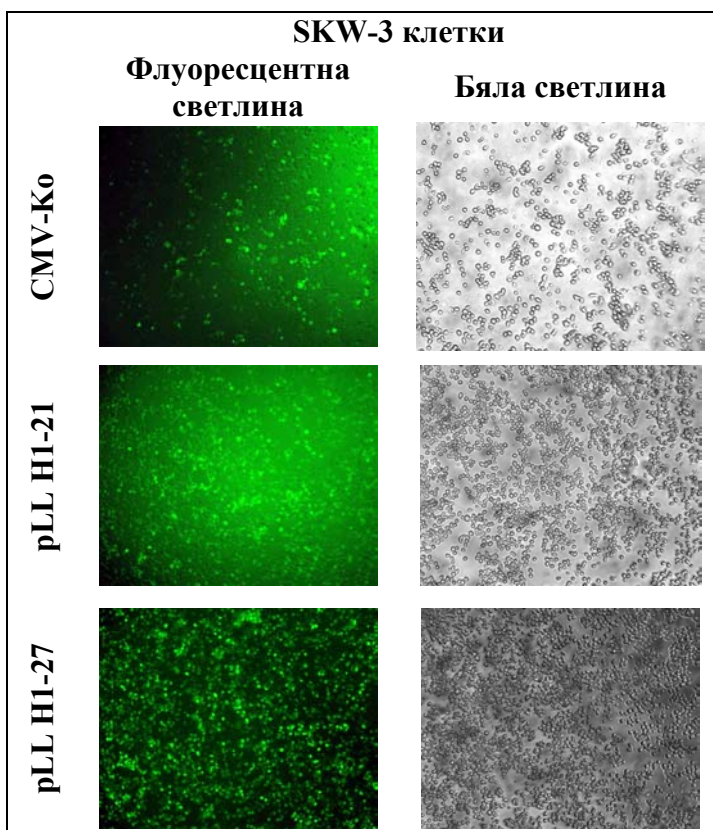
Трансфектирането беше извършено при множественост на инфекцията $MOI = 30$ (брой лентивирусни частици на клетка).

Ефикасността на трансфекцията беше контролирана чрез преброяване на флуоресциращите трансфектирани клетки с флуоцитометър и чрез заснемането им в култура с помощта на микроскоп с филтър за зелена флуоресценция. Резултатите са представени на фиг. 22. Флуоресциращите клетки от *CMV-контролата* и пробата *pLL H21*, които носят вирусния вектор, бяха сортирани с помощта на лазерен сортер.

Ефикасността на клонираните олигонуклеотиди беше определена с помощта на квантитативна *PCR* и имуноблот. От направения анализ е видно, че количеството на *Rb-иРНК* намалява до 14% и 16% след трансфектиране на клетките с двата варианта на вектора (фиг. 23А). Намаленото количество на матрицата, нужна за синтеза на *Rb-протеина* води аналогично до намаляване и на неговото ниво в инфектираните клетки (фиг. 23Б).

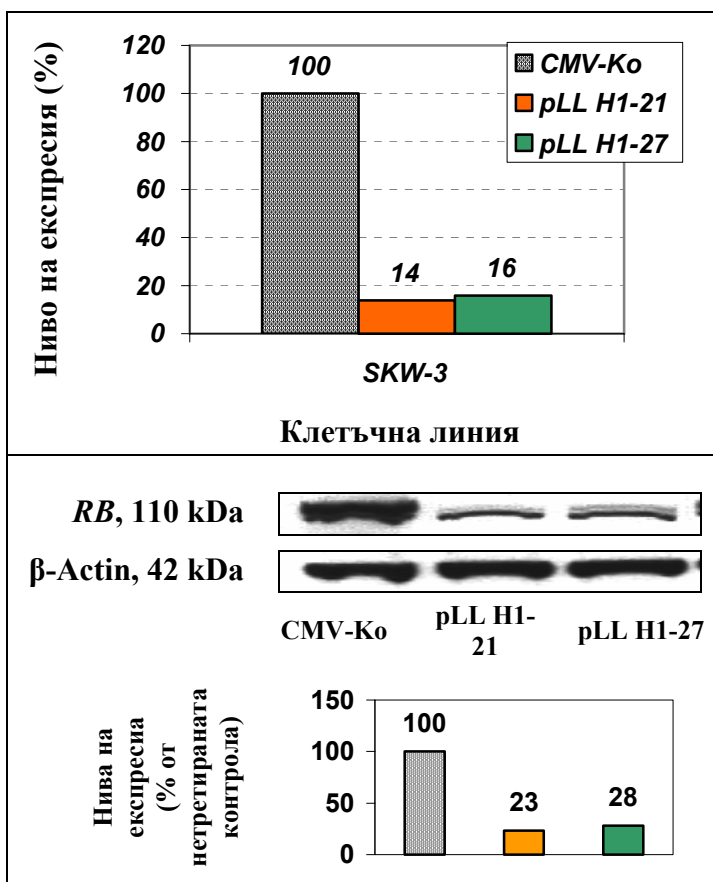
Табл. 10. Брой на трансфектираните клетки в проценти при клетъчната линия SKW-3, 14 дни след трансфекция и непосредствено преди стартиране експеримента с *EgPC3* - преброяване и сортиране с флуоцитометър.

Клетъчна линия \ вид плазмид	Процент клетки преди и след сортиране					
	CMV-Co		pLL H1-21		pLL H1-27	
	преди сортиране	след сортиране	преди сортиране	след сортиране	преди сортиране	след сортиране
SKW-3	37,56	89,66	94,68	98,65	98,79	-



Фиг. 22.

Микроскопски снимки на клетки SKW-3 в нативна култура след трансфекция с лентивирусни частици, носещи три различни вирусни плаزمиди. Снимките са направени паралелно с филтър за наблюдение на EGFP-протеин и видима светлина при увеличение 50x и експозиция 1 сек.



Фиг. 23А Намаление на нивото на иРНК за Rb-протеина в левкемичната клетъчна линия SKW-3 след стабилна трансфекция на вирусен плазмид LentiLox 3.7 с лентивируси - qPCR анализ.

Фиг. 23Б Имуноблот с моноклонално антитяло срещу ретинобластомния протеин Rb в SKW-3 след трансфекция на вирусен плазмид LentiLox 3.7 с лентивируси.

CMV-Ko: контрол с експресия на hpRNA с неутрална РНК-последователност; pLL H1-21: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 21 нуклеотида; pLL H1-27: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 27 нуклеотида.

9.1. Виталност на SKW-3 левкемични клетки след третиране с Erufosine в условията на Rb-потискане

Представените на фиг. 24А данни показват, че след третиране с 2 μM Erufosine клетките с експресия на pLL H27 пролиферират по-бързо, отколкото клетките в останалите две проби, третирани с 4 μM и 8 μM Erufosine. На 24-ия час от началото на третирането клетките с експресия на hpRNA H1-27 са с 22 % повече от клетките с експресия на неутрална секвенция (CMV-Ко), а клетките, експресиращи hpRNA H1-21 са със 17 % повече от контролата. Тази тенденция се запазва при pLL H27 пробата до 72-ия час включително, като разликите спрямо контролата са статистически достоверни (табл. 11А). Виталността на клетките в пробата pLL H21 на 72-ия час не се различава от тази на CMV-контролата. На 96-ия час се отчита обратната тенденция - виталните клетки с експресия на hpRNA H1-27 намаляват и по количество са равни на контролата, докато клетките, експресиращи по-късата РНК-секвенция имат експоненциална крива на растеж. Процентът на виталните клетки в пробата pLL H1-27 на 12-ия, 24-ия, 48-ия, 72-ия и 96-ия е съответно 100, 101, 110, 105 и 91 %. От тези данни се вижда, че клетъчната виталност намалява под 100 % едва след 72-ия час. Процентът на виталните клетки в пробата pLL H1-21 на 12-ия, 24-ия, 48-ия, 72-ия и 96-ия е съответно 99, 96, 98, 91 и 101 %. От тези стойности се вижда, че клетките намаляват с 10 % до 72-ия час, след което отново нарастват до 100 %. Процентът на виталните клетки в пробата CMV-Ко за 12-ия, 24-ия, 48-ия, 72-ия и 96-ия е съответно 96, 79, 83, 86 и 90 %, т.е. най-малко витални клетки (79%) има на 24-ия час, след което техният брой се увеличава отново, без да достигат 100 %, както при клетките с Rb-потискане.

След третиране с Erufosine в концентрация 4 μM се установява отново по-бърз клетъчен растеж в пробите pLL H1-21 и pLL H1-27 спрямо CMV-контролата. Спектрофотометричното измерване на екстинкцията на живите клетки, 24 часа след третирането, показва, че живите клетки с експресия на pLL H1-21 и pLL H1-27 са съответно с 9 % и 16 % повече, в сравнение с живите клетки в контролата (табл. 11Б, фиг. 24Б). До 72-ия час от началото на третирането клетките, експресиращи hpRNA H1-27, пролиферират с по-висока скорост, в сравнение с другите клетки, като на 72-ия час те са с 17 и 16 % повече от клетките, съответно в пробите CMV-Ко и pLL H1-21. На 96-ия час от

началото на третирането с Erufosine, количеството на виталните клетки във всички проби е еднакво и с 30 до 35 % по-малко от нетретиранта контрола на съответната проба.

Третирането на трансфектираните SKW-3 левкемични клетки с 8 μ M Erufosine показва на 96-ия час от началото на третирането намаляване на броя на виталните клетки във всички проби с 82 до 85 %. На 24-ия и 48-ия час са отчетени важни разлики в цитотоксичния ефект на Erufosine спрямо отделните проби. Количеството на виталните клетки в пробите с Rb-потискане е по-голямо, отколкото в пробата CMV-Ко, където няма промяна в Rb-експресията. Процентът на живите клетки в пробата pLL H1-27 на 12-ия, 24-ия, 48-ия, 72-ия и 96-ия е съответно 98, 88, 73, 61 и 30 %, т.е. на 24-ия и 48-ия час са със съответно 15 и 16 % по-малко от тези в CMV-контролата. Виталните клетки в пробата pLL H1-21 на 12-ия, 24-ия, 48-ия, 72-ия и 96-ия са съответно 87, 66, 54, 28 и 18 %. От тези стойности се вижда, че клетките намаляват между 12-ия и 72-ия час по-бавно от тези с експресия на неутрална РНК-последователност, като на 24-ия и 48-ия час са съответно с 8 и 9 % по-малко от CMV-контролата. Същевременно с това на 24-ия и 48-ия час те са със 7 % по-малко от клетките, експресиращи продългата РНК-секвенция. Процентът на живите клетки в пробата CMV-Ко на 12-и, 24-и, 48-и, 72-и и 96-и час е съответно 80, 58, 45, 25 и 16 %, което показва, че при експресия на неутрална секвенция и съответно липса на Rb-потискане, виталните клетки намаляват по-бързо (табл. 11В, фиг. 24В).

Въз основа на получените резултати, може да се направи обобщението, че наличието на Rb-потискане в левкемичните клетки SKW-3 създава условия за повишена виталност и устойчивост на клетките при третирането им с Erufosine в различни концентрации (2-8 μ M).

Табл. 11 Процент витални SKW-3 клетки след третиране с 2 (11А), 4 (11Б) и 8 μ М (11В) Erufosine в условията на стабилно Rb-потискане (MTT-тест).

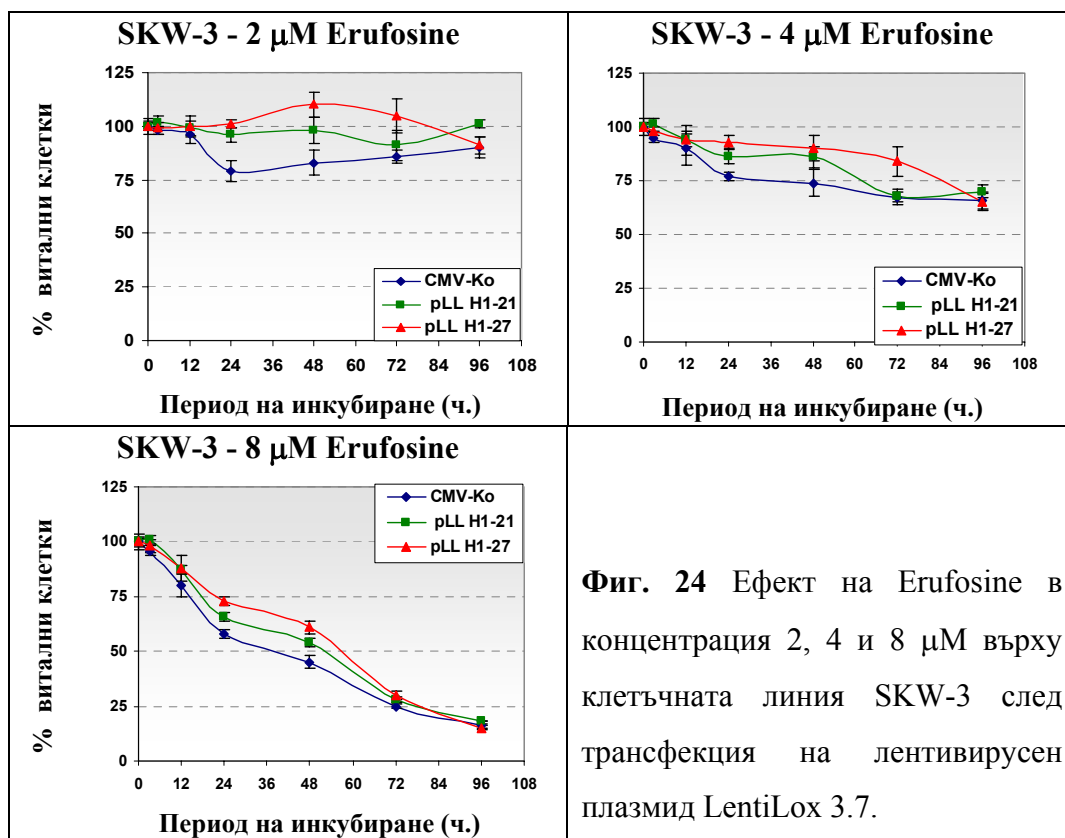
А		T/C % $\pm$ SD					
час на отчитане	Третирана група	0	12	24	48	72	96
	CMV-Ko	100 $\pm$ 2	96 $\pm$ 4	79 [#] $\pm$ 5	83 [#] $\pm$ 6	86 [^] $\pm$ 3	90 [#] $\pm$ 5
	pLL H1-21	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 3	96* [^] $\pm$ 3	98* [^] $\pm$ 6	91 [^] $\pm$ 7	101* [^] $\pm$ 2
	pLL H1-27	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 5	101* [#] $\pm$ 2	110 * [#] $\pm$ 6	105 * [#] $\pm$ 8	91 [#] $\pm$ 4

Б		T/C % $\pm$ SD					
час на отчитане	Третирана група	0	12	24	48	72	96
	CMV-Ko	100 $\pm$ 2	90 $\pm$ 8	77 [#] $\pm$ 2	74 [#] $\pm$ 6	67 [^] $\pm$ 3	66 $\pm$ 4
	pLL H1-21	100 $\pm$ 2	94 $\pm$ 3	86* [^] $\pm$ 3	86* $\pm$ 5	68 [^] $\pm$ 3	70 [^] $\pm$ 3
	pLL H1-27	100 $\pm$ 4	94 $\pm$ 7	93* [#] $\pm$ 3	90 $\pm$ 6	84* [#] $\pm$ 7	65 [#] $\pm$ 4

В		T/C % $\pm$ SD					
час на отчитане	Третирана група	0	12	24	48	72	96
	CMV-Ko	100 $\pm$ 2	80 [#] $\pm$ 5	58 [#] $\pm$ 2	45 [#] $\pm$ 3	25 [#] $\pm$ 1	16 [#] $\pm$ 1
	pLL H1-21	100 $\pm$ 2	87* $\pm$ 2	66 * [^] $\pm$ 2	54* [^] $\pm$ 2	28* $\pm$ 1	18* [^] $\pm$ 0
	pLL H1-27	100 $\pm$ 4	88* $\pm$ 6	73* [#] $\pm$ 2	61* [#] $\pm$ 3	30* $\pm$ 2	15 [#] $\pm$ 1

CMV-Ko: контрола с експресия на hpRNA с неутрална РНК-последователност; **pLL H1-21:** експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 21 нуклеотида; **pLL H1-27:** експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 27 нуклеотида.

T/C % - Процент витални клетки в сравнение с Ko; **SD** Стандартно отклонение; * $P < 0,05$ Статистически значима разлика спрямо стойността на пробата CMV-Ko; [#] $P < 0,05$ Статистически достоверна разлика спрямо стойността на пробата pLL H1-21; [^] Статистически достоверна разлика спрямо стойността на пробата pLL H1-27.



Фиг. 24 Ефект на Erufosine в концентрация 2, 4 и 8 μM върху клетъчната линия SKW-3 след трансфекция на лентивирусен плазмид LentiLox 3.7.

CMV-Ko: контрола с експресия на hpRNA с неутрална РНК-последователност; pLL H1-21: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 21 нуклеотида; pLL H1-27: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 27 нуклеотида.

9.2. IC₅₀-стойности на Erufosine върху клетъчната линия SKW-3 в условията на Rb-потискане и нормална Rb-експресия

С цел оценка на ролята на ретинобластмния протеин Rb върху механизма на действие на алкилфосфохолина Erufosine и резистентността на клетките спрямо неговото действие, ние проведохме сравнителен анализ на ефекта на Erufosine въз основа на стойностите на инхибиращата концентрация, изчислена след 48-часово въздействие върху левкемичните клетки SKW-3, в условията на потиснат синтез на Rb-протеина и я сравнихме с IC₅₀ при клетки от същата клетъчна линия, експресиращи неутрална РНК-секвенция, която не генерира Rb-потискане. Данните, обработени с програмата GraphPadPrizm, са представени в табл. 12 и на фиг. 25.

Сравнителният анализ показва, че при концентрация на Erufosine 2 μM разликата във виталността на клетките от пробата pLL H1-27 и CMV-контролата възлиза на 27%, т.е. клетките с експресия на hpRNA H1-27 са с 27% повече, отколкото в контролата. В условията на Rb-потискане, постигнато с плазмид

pLL H1-21, клетките са с 15% повече от контролата, експресираща неутрална РНК-последователност. При двукратно повишаване на концентрацията на Erufosine (4 μ M) клетките в контролата намаляват до 74%, а тези с инхибиран Rb-протеин в пробите pLL H1-21 и pLL H1-27 са съответно 87% и 90%.

При клетките в пробата CMV-Ko, които са с незасегнат синтез на ретинобластния протеин Rb, средната инхибираща концентрация на алкилфосфохолина Erufosine се изчислява на 7 μ M, което като стойност не се различава от IC₅₀, характерна за нетрансфектирани SKW-3 клетки. При концентрация на Erufosine 8 μ M, клетките в контролата с неутрална РНК-секвенция са 45% от нетретираната контрола на същата проба, докато клетките в останалите две проби са над 54% (54% за пробата pLL H1-21 и 61% за клетките с геномна интеграция на pLL H1-27), което показва, че стойностите на IC₅₀ на клетките в двете проби са над 8 μ M. Тези резултати показват, че в условията на намалена експресия на протеина Rb чувствителността на клетките към Erufosine намалява. Или цитотоксичният ефект на Erufosine е по-силно изразен при клетките със запазена експресия на Rb-протеина.

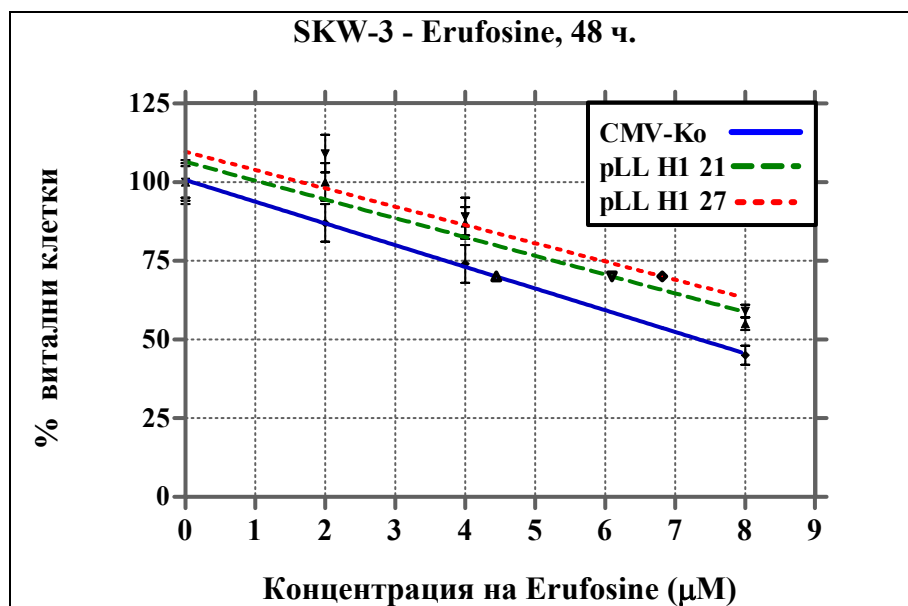
Получените от нас резултати свидетелстват за важното значение на Rb-протеина за получаваната цитотоксичност от Erufosine и са косвено доказателство за участието на ретинобластния протеин в механизма на действие на този алкилфосфохолин.

Табл. 12 Влияние на Erufosine върху SKW-3 клетки след трансфекция с лентивирусен плазмид pLL 3.7 - сравнение на IC₅₀ на трите проби.

Третирани проби	T/C % ± SD				IC ₅₀
	Концентрация на Erufosine:				
	0 μM (Ko)	2 μM	4 μM	8 μM	
CMV-Ko	100 ± 5	83 ± 6	74 ± 6	45 ± 3	7,35 μM
pLL H1-21	100 ± 6	98 ^{*,#} ± 6	87 [*] ± 5	54 ^{*,#} ± 2	> 8 μM
pLL H1-27	100 ± 7	110 ^{*,#} ± 6	90 [*] ± 6	61 ^{*,#} ± 2	> 8 μM

Ko: нетретирана контрола; **CMV-Ko:** контрола с експресия на hpRNA с неутрална РНК-последователност; **pLL H1-21:** експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 21 нуклеотида; **pLL H1-27:** експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 27 нуклеотида.

T/C % - Процент витални клетки от нетретираната контрола; **SD** Стандартно отклонение; * P<0,05 Статистически значима разлика спрямо стойността на пробата CMV-Ko; # P<0,05 Статистически значима разлика между стойностите на пробите pLL H1-21 и pLL H1-27.



Фиг. 25 IC_{50} на Erufosine при клетъчната линия SKW-3 след трансфекция на лентивирусен плазмид LentiLox 3.7, изчислена след период на третиране от 48 ч. **CMV-Ko**: контрола с експресия на hpRNA с неутрална РНК-последователност; **pLL H1-21**: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 21 нуклеотида; **pLL H1-27**: експресия на hpRNA с комплементарност към Rb-иРНК и дължина на комплементарния участък 27 нуклеотида. IC_{50} е изчислен с помощта на компютърната програма GraphPadPrizm.

ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ИЗВОДИ

1. Проучено е цитотоксичното действие на Erufosine при четири левкемични клетъчни линии, три лимфомни клетъчни линии и две клетъчни линии с произход от солидни човешки тумори и са получени данни за спектъра на неговата цитостатична активност. Направена е сравнителна биооценка на степента на действие на алкилфосфохолина във водно-етанолов разтвор и липозомна суспензия.
 - 1.1. Erufosine се отличава с изразена цитотоксичност при клетките с лимфоиден фенотип – SKW-3, BV-173 и при клетките MDA-MB; сравнително по-нисък цитотоксичен ефект – при миелоидните клетъчни линии и най-слабо изразена цитотоксичност – при лимфоидните клетки HD-MY-Z и клетките с произход от остеосарком SAOS-2.
 - 1.2. Инхибиращите концентрации IC_{50} на водно-етанолов разтвор на Erufosine са около два пъти по-ниски при всички клетъчни линии, с изключение на K-562 и в сравнение с IC_{50} на липозомната форма, като постигнатият максимален цитостатичен ефект е равнозначен при високите концентрации.
2. Проучено е влиянието на Erufosine върху клоногенната способност на K-562 клетките и са получени данни за антиклоногенен ефект. Липозомната форма постига по-изразена инхибиция на образуването на клетъчни колонии (до 43% инхибиране), отколкото водно-етаноловият разтвор (до 60% инхибиране)
3. За първи път е установен протективен ефект на Erufosine спрямо хемопоеичните клетки при приложението му в комбинация с Bendamustine, Epirubicine, Ara C, Pemetrexed и Gemcitabine. Erufosine намалява миелосупресията, индуцирана от цитостатиците.
4. За първи път са получени данни за *in vitro* взаимодействията между Erufosine и цитостатиците Bendamustine, Ara C, Epirubicine и Imatinib при левкемични и лимфомни клетъчни линии. Постигането на синергизъм, адитивен ефект или антагонизъм зависи от последователността на прилагане на съединенията, от приложените концентрации и от вида на клетъчната линия.

- 4.1. Установен е синергизъм в действието на Erufosine и Imatinib или Epirubicine, при първоначално прилагане на алкилфосфохолина; постига се синергизъм при комбинациите с Bendasmustine или Imatinib, при последващо прилагане на Erufosine.
- 4.2. Определени са антагонистични взаимодействия между Erufosine и Bendamustine или Erufosine при първоначално прилагане на Erufosine.; антагонизъм е налице и при комбинацията между Erufosine и Epirubicine, при последващо прилагане на алкилфосфохолина.
- 4.3. Като нерационални се определят комбинациите Erufosine/ Ara C и Epirubicine/ Erufosine.
5. Erufosine самостоятелно променя в незначителна степен разпределението на клетките в отделните фази на клетъчния цикъл. При прилагането му в комбинация с Epirubicine се увеличава клетъчната фракция във фаза G2. При прилагането му в комбинация с Ara C се увеличават клетките в суб-G1-фракцията.
6. Erufosine повлиява фосфоинозитолната PIP3-система и биомолекули на апоптозните сигнални пътища.
 - 6.1. Erufosine инхибира активността на протеин-киназа B и последващото повишаване на експресията на циклин E/CDK2-инхибиторния протеин p27.
 - 6.2. Erufosine стимулира проапоптозния протеин Bad, но този ефект се последва от засилване на експресията на проапоптозния протеин Bcl-xL.
7. Erufosine като мембранно-активно съединение променя разпределението на онкопротеина BCR-ABL и протеин киназа B в липидните рафтове. Erufosine намалява експресията на BCR-ABL, с което може да се обясни цитостатичният ефект при миелоидните клетъчни линии с експресия на онкопротеина BCR-ABL.
8. Erufosine стимулира експресията на ретинобластомния протеин Rb, като повишава нивото му при левкемични клетки, с което способства за забавяне и спиране на пролиферация.
9. Разработени са два модела на клетки с преходно или стабилно потисната Rb-експресия и е установено важното значение на Rb-индукцията за механизма на действие на Erufosine.

9.1. Erufosine стимулира експресията на Rb-протеина при условията на временно потисната Rb-експресия при BV-173 клетки.

9.2. Чувствителността на BV-173 и SKW-3 клетките към Erufosine намалява при условията на потисната Rb-експресия, индуцирана от антисенс-олигонуклеотиди или от РНК-последователности.

Научни приноси

I. Приноси, свързани с определяне на ефекта на Erufosine спрямо туморно-трансформирани и нормални хемопоетични клетки.

1. Потвърдени са данните за наличие на цитотоксичност на алкилфосфохолина Erufosine върху туморно-трансформирани клетки от различен произход. С това е допълнена характеристиката на Erufosine като съединение с цитостатична активност и е определен спектъра на неговото действие при *in vitro* условия.
2. За първи път е установен протективен ефект на Erufosine спрямо хемопоетичните клетки при приложението му в комбинация с Bendamustine, Ara C, Epirubicine, Pemetrexed и Gemcitabine. Erufosine намалява миелосупресията, индуцирана от цитостатици, с 10-100%. В концентрация 30 μ M Erufosine не е токсичен спрямо мишите костно-мозъчни клетки.

II. Приноси, свързани с *in vitro* взаимодействието между Erufosine и клинично прилагани цитостатици.

За първи път са получени при *in vitro* условия данни за взаимодействията между Erufosine и цитостатиците Bendamustine, Ara C, Epirubicine и Imatinib при левкемични и лимфомни клетъчни линии. Определено е наличието на синергизъм, антагонизъм и адитивен ефект, в зависимост от вида на клетъчната линия, концентрацията на цитостатика и последователността на прилагането им. Тези данни позволяват съставянето на терапевтично полезни комбинации и елиминират възможността от съставяне на комбинирани схеми, при които е възможен антагонизъм в ефектите. Ние приемаме, че клетъчните тест-системи са подходящ модел за пре-скрининг на вида на лекарствените взаимодействия, с което може да се улесни подбора на компонентите на комбинираната схема и последователността на тяхното приложение.

1. Установен е синергизъм в ефектите на Erufosine при последователно приложение в следните комбинации: Bendamustine/ Erufosine; Imatinib/ Erufosine; Erufosine/ Imatinib; Ara C/ Erufosine при клетъчната линия K-562; Erufosine/ Epirubicine при клетъчните линии HD-MY-Z, K-562, BV-173, AR-230.
2. Определен е антагонизъм между Erufosine и цитостатиците при комбинациите: Erufosine/ Bendamustine; Ara C/ Erufosine при клетъчната линия AR-230; Erufosine/ Ara C; Epirubicine/ Erufosine при клетъчната линия K-562.

III. Приноси, свързани с изясняване механизма на действие на Erufosine.

1. За първи път при K-562 клетките са получени данни за инхибиращото влияние на Erufosine върху протеин-киназа В и повишаването на експресията на циклин E/CDK2-инхибиторния протеин p27. Тези резултати потвърждават налични литературни данни за влиянието на други алкилфосфохолини върху експресията на протеинкиназа В при други клетъчни линии. Те допринасят за изясняване механизма на действие на Erufosine във връзка с антипролиферативния ефект и спиране на прогресията на клетъчния цикъл в G₁ фаза.
2. За първи път е определено влиянието на Erufosine върху протеини от Bcl-2-фамилията. Erufosine стимулира образуването на проапоптозния протеин Bad, с което способства за апоптоза на клетките. Установената последваща свръхекспресия на антиапоптозния протеин Bcl-xL вероятно е защитен клетъчен механизъм за възстановяване на индуцирания клетъчен дисбаланс между апоптозни и антиапоптозни пътища. Това може да е вероятната причина за резистентността на преживелите K-562 клетки към Erufosine при концентрациите в диапазона от 12,5 - 50 μ M.
3. За първи път е определено влиянието на Erufosine върху взаимовръзката между онкопротеините BCR-ABL и липидните рафтове в клетъчната мембрана. Установено е включване на BCR-ABL в липидните фракции, съдържащи липидни рафтове. По този механизъм Erufosine възпрепятства взаимодействието на патологичния протеин с неговите клетъчни субстрати. Паралелно с това бе установено намаляване на експресията на BCR-ABL под действието на Erufosine, което представлява важен механизъм за

цитотоксичния му ефект, постиган при миелоидните клетки, експресиращи фузионния онкопротеин.

4. За първи път е определено влиянието на Erufosine върху експресията на ретинобластомния протеин Rb - регулатор на клетъчния цикъл. Установено е, че индукцията на Rb-протеина има важно значение за цитотоксичността на Erufosine, тъй като води до модулиране на Rb-сигналните пътища, които участват в механизма на действие на алкилфосфохолина.

- 4.1. Erufosine повишава нивото на Rb при левкемичните K-562 клетки, с което повлиява регулацията на клетъчния цикъл и допринася за спирането на туморната пролиферация.

- 4.2. Значението на индукцията на Rb бе изяснено чрез разработени от нас (по известна технология) клетъчни модели с преходен Rb-дефицит и стабилно потисната Rb-експресия, които имат оригинален характер. Индукцията на Rb играе ключова роля в модулацията на сигналната трансдукция, предизвикана от Erufosine, което е съществен оригинален принос при изясняване на фармакодинамиката на новото антинеопластично средство Erufosine с липсваща миелосупресивна активност и стимулиращи нормалната хемопоеза свойства.

- 4.2.1. С МТТ-тест и CFU-анализ беше установено намаляване на чувствителността на левкемичните популации при клетъчните линии BV-173 и SKW-3 към действието на Erufosine след потискане на Rb-експресията.

- 4.2.2. Третирането с Erufosine възстановява до голяма степен първоначалното ниво на експресия на ретинобластомния протеин при клетъчната линия BV-173.

Проведените фармакодинамични изследвания за определяне на цитотоксичния ефект на Erufosine и профила на неговата безопасност спрямо хемопоетичните клетки позволяват да се приеме, че Erufosine като представител на алкилфосфохолините е перспективно противотуморно съединение с мембранно-активни свойства и инхибиращо или стимулиращо влияние върху различните биомолекули на клетъчните сигнални пътища.

ПУБЛИКАЦИИ НА АВТОРА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **M. M. Zaharieva**, S. M. Konstantinov, M. R. Berger (2002); Experimental investigation of the antileukemic activity of Gleevec. Oncologus, No. 2;
2. **M. M. Zaharieva**, S. M. Konstantinov, B. Pilicheva, M. Karaivanova and M. R. Berger (2006); Erufosine: a membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects. NYAS, 1095: 182-192; (Impact factor 1,97);
3. **Zaharieva M.**, Petkov N., Pilicheva B., Yosifov D., Momekov G., Konstantinov S., Berger M. Evaluation of the combined effects of erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (ErPC3), gleevec and bendamustine on normal and malignantly transformed haematopoietic cells. Pharmacia 2005 52:1-2 (90-98);
4. D.Y.Yosifov, I.K.Dineva, **M.M.Zaharieva**, S.M.Konstantinov, M.R.Berger (2007); "The expression level of the tumor suppressor retinoblastoma protein (Rb) influences the antileukemic efficacy of erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (ErPC3)." Cancer Biology and Therapy 6:6 (e1-e6) (Impact factor 3,279).

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **M. Zaharieva** (2001); Wirkung des neuen Alkylphosphochlols ErPC3 und Antisense-Oligonukleotides b3a2 auf die Expression der Onkoproteine Rb und Bcr-Abl. Wissenschaftliche Studententagung, 50 Jahre Pharmazeutische Fakultät, Oktober 2001, Sofia, Bulgaria, P. 9.
2. **Maya Zaharieva**, Bissera Pilicheva, Spiro Konstantinov, Margarita Karaivanova. Martin R. Berger, "Pharmacological evaluation of the antileukemic efficacy of Erucylphospho - N, N, N - trimethylpropylammonium (ErPC₃) and Gleevec (STI-571) in vitro". Third Congress on Pharmacy of Macedonia with International Participation.

- Macedonian pharmaceutical bulletin 49 (1, 2) (2003), PP - 90, October 5-9, 2003, Hotel Metropol, Ohrid.
3. A. Kostovski, **M. Zaharieva**, N. Nikolov, S. Konstantinov. Combination effect of Bendamustine with Erucylphospho- N, N, N -trimethyl propanolamine (ErPC3). VII National Congress of Clinical and Transfusion Hematology. Non Malignant Blood Diseases and Miscellanea, pp. 44-45. Sofia, Bulgaria, 9-10 October 2003.
 4. **M. M. Zaharieva**, B. Pilicheva, A. Kostovski, S.M. Konstantinov, M.C. Karaivanova. Erucylphospho-N, N, N, -trimethylpropanolamine (ErPC3) can ameliorate the hematological toxicity of Benadmustine. First International Conference on Cancer Therapeutics Molecular Targets, Pharmacology an Clinical Applications, February 19-21, 2004 - Palazzo dei Congressi, Florence, Italy. Journal of Chemotherapy, Volume 16, Supplement n.1, February 2004.
 5. D. Yosifov, **M. Zaharieva**, S. Konstantinov. Combined effects of Erucylphospho-N, N, N, -trimethylpropanolammonium (ErPC3) and other cytostatics on malignant cell lines and normal bone marrow cells. Third International congress of Medical Sciences for Students and Young Doctors, 13-16 May, 2004, Sofia, Bulgaria. Tribuna Medica, Supplement to Issue 1/2004, volume LVI, p. 34.
 6. **M. Zaharieva**, B. Pilicheva, D. Yosifov, N. Petkov, G. Momekov, S. Konstantinov. Evaluation of the combined effects of Erucylphospho-N, N, N, -trimethylpropanolamine (ErPC3), Gleevec and Bendamustine on normal and malignantly transformed haematopoietic cells. 14-th Annual Assembly of IMAB, 26-30 May 2004, Varna, IHS "F.J. Curie".
 7. **M. Zaharieva**, N. Petkov, B. Pilicheva, D. Yosifov, G. Momekov, S. Konstantinov, M. Berger. Evaluation of the combined effects of erucylphospho-N,N,N,-trimethylpropylammonium (ErPC3), Gleevec and Bendamustine on normal and malignantly transformed haemopoietic cells. The 4th International Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics, September 20-22, 2004, Istanbul, Turkey.
 8. **Maya M. Zaharieva**, Nikolai Petkov, Bissera Pilicheva, Spiro M. Konstantinov, Margarita Karaivanova, Martin R. Berger. Combination effects of Erucylphospho-N,N,N-trimethyl-propylammonium with Gleevec, Cytosine

- arabinside or Epirubicine on normal and malignant haematopoietic cells. 12th Panhellenic pharmaceutical Congress, 14-16 May, 2005, Athena, Greece.
9. **M. M. Zaharieva**, B. Pilicheva, S. M. Konstantinov, M. R. Berger. Das neue Alkylphosphocholin Erufosin vermindert die Knochenmarktoxizitaet von klassischen Zytostatika. Der 42. Kongress der Suedwestdeutschen Gesellschaft fuer Innere Medizin, 21-22. Oktober 2005.
 10. **Maya M. Zaharieva**, Spiro M. Konstantinov, Martin R. Berger. Erufosine: a membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects. Cell Signaling Word 2006 - Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Luxembourg, 25-28 January, 2006.
 11. **Maya M. Zaharieva**, Milen Kirilov, Minqiang Chai, Stefan Berger, Spiro M. Konstantinov, Martin R. Berger. Impact of Rb knock down for the erufosine signal transduction modulation in human leukemia cells. Cell Signaling Word 2006 - Signal Transduction Pathways as therapeutic targets, Luxembourg, 25-28 January, 2006.
 12. **M.M. Zaharieva**, B. Pilicheva, G. Momekov, S. Konstantinov, M. Karaivanova, M.R. Berger. Signal transduction modulating effects of the new alkylphosphocholine Erufosine on the malignant haematopoietic cell line K-562. 29th Balkan Medical Week, 28-30 September 2006, Golden sands, Varna, Bulgaria.

Експерименталната работа беше извършена в Лабораторията по “Молекулярна фармакология и химиотерапия” при Катедра по Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология на Фармацевтичния Факултет, МУ-София и в Немския Център за Онкологични Изследвания в Хайделберг, Германия.

Изказвам своята благодарност на:

- Научния си ръководител Проф. д-р М. Караиванова - за безрезервната подкрепа и ценните научни съвети и идеи при разработването на настоящия дисертационен труд,
- Проф. д-р М. Бергер - за подкрепата и за ценните насоки и идеи по време на експерименталната дейност в Немския Център за Онкологични Изследвания в Хайделберг, Германия,
- Д-р С. Константинов - за реализацията на експерименталната част и за идейната постановка на представената научна работа,
- Доц. д-р М. Генова - за провеждането на изследванията с помощта на поточна цитометрия в Центъра по Хематология и Трансфузиология, София,
- S. Berger (PhD) - сътрудник към лабораторията по Молекулярна биология в Института по психично здраве в Манхайм - Германия, М. Кирилов (PhD) и М. Chai (PhD) - сътрудници към лабораторията по Клетъчна биология в Центъра за онкологични изследвания в Хайделберг - Германия, за разработването на модел на клетъчната линия SKW-3 със стабилно потисната експресия на ретинобластомния протеин чрез трансфекция с лентивируси,
- Колегите от Лабораторията по Молекулярна Фармакология и Химиотерапия при Катедра по Фармакология, Фармакотерапия и Токсикология на Фармацевтичния Факултет, МУ-София и от Лабораторията по Токсикология и Химиотерапия в Немския Център за Онкологични Изследвания, Хайделберг, Германия за прекрасната творческа работна атмосфера и помощта по време на изследванията,
- Родителите ми, които ме подкрепяха неизменно при всички трудности, свързани с провеждането и защитата на доктората,
- Всички колеги и приятели, които са ме подкрепяли при разработването на дисертационния труд.