



## Информация за изпълнение на етап на проект

<b>Наименование на конкурса:</b>
Конкурс за финансиране на научни изследвания – 2017г
<b>Основна научна област:</b>
Биологични науки
<b>№ на договор:</b>
ДН 11-1/2017
<b>Начална и крайна дата на проекта:</b>
14.12.2017-14.12.2020
<b>Заглавие на проекта:</b>
Нов подход за потискане на пролиферативния потенциал и индуциране на апоптоза на базата на модулиране на клетъчния „сфинголипиден реостат“ в 2D и 3D клетъчни култури от човешки белодробен аденокарцином
<b>Базова организация:</b>
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство -БАН
<b>Партньорски организации:</b>
СУ „Св.Кл. Охридски“
<b>Ръководител на научния колектив (академична длъжност, научна степен, име):</b>
Проф. дбн Албена Момчилова
<b>Общ размер на отпуснатото финансиране за първи етап:</b>
60 000лв
<b>Интернет страница на проекта (ако има такава):</b>
<b>Научни публикации по проекта:</b>
A. Momchilova, R. Tzoneva, T. Markovska, M. Hadzhilazova, L. Maslenkova, R. Pankov Genistein alters sphingosine-1phosphate levels in A549 lung adenocarcinoma cells. C. R..Bulg. Acad. Sci. (in press)
V. Uzunova, R. Tzoneva, T. Stoyanova, R. Pankov, R. Skrobanska, L. Maslenkova, A. Momchilova. Dimethylsphingosine and miltefosine induce apoptosis in lung adenocarcinoma cells in a synergistic manner. Chem Biol Interact (submitted)



**Описание на очакваните резултати по проекта (до 1 стр. в рамките на полето по-долу):**

Целта на настоящия проект е да се разработи и предложи нов подход за редуциране на пролиферативния потенциал и инициране на апоптотични процеси в човешки белодробни аденокарциномни клетки, на базата на насочени промени в сфинголипидния метаболизъм и модулиране на баланса на т.нар. „сфинголипиден реостат”. Този подход цели да промени динамичното равновесие, което съществува в рамките на сфингомиелиновия сигнален път в туморните клетки, като се редуцират нивата на про-пролиферативния сфинголипид сфингозин-1-фосфат, за сметка на повишаване нивото на про-апоптотичния церамид, чрез блокиране на активността на сфингозин-1-фосфат – формирация ензим сфингозин-киназа.

Предвидено е прилагането на инхибитор на ензима сфингозин-киназа, в резултат на чието действие се очаква значителна редукция на нивата на сфингозин-1-фосфат, за сметка на акумулиране на про-апоптотичния церамид. Успоредно, се предвижда провеждане на изследвания на здрави епителни клетки, които ще служат като контроли и чрез които ще бъде преценено наличието на странични ефекти, причинени от приложената терапия, върху здрави клетки. Тъй като има данни, че в някои изолирани случаи повишението на церамида се оказва недостатъчно за индуциране на апоптоза, предвижда се клетките да бъдат третирани и с представител на групата на алкилфосфохолините, които са сравнително нова генерация антитуморни агенти и се отличават с ниска цитотоксичност.

Като модел на изследванията е предвидено използването на клетки от човешки белодробен аденокарцином от линия A549 и здрави човешки епителни клетки, под формата на конвенционални (монослойни) и три-размерни (3D) клетъчни култури, като последните се считат за системи, много по-близки да условията на развитие *in vivo*. В работната програма са заложили анализи на промените, индуцирани от антитуморните агенти в клетъчната виталност, сфинголипидните метаболити, степента на развитие на апоптоза, цитотоксичността, мембранните липиди и тяхната структурна организация при туморни белодробни и контролни епителни клетки.

Ние считаме, че на базата на получените резултати може да се предложи комбинирана антитуморна терапия, която поради прилагането на по-ниски дози от всеки отделен антитуморен агент, ще бъде по-щадяща по отношение на здравите епителни клетки.



## Членове на научния колектив

<b>Организации/участници<sup>1</sup></b>	<b>Бележка<sup>2</sup></b>
<b>Базова организация:</b>	
Институт по биофизика и биомедицинско инженерство -БАН	
<b>Ръководител на научния колектив</b>	
Проф. дбн Албена Момчилова	
<b>Участници:</b>	
Проф. д-р Румяна Цонева Проф. д-р Галя Станева Проф. дбн Лиляна Масленкова Асист. Веселина Узунова Биолог Таня Марковска Докторант Тихомира Стоянова	ПД ДО
<b>Партньорска организация:</b>	
СУ“Св, Кл. Охридски“	
<b>Участници:</b>	
Чл. Кор. Румен Панков	
<b>Партньорска организация:</b>	
Laboratoire “Matiere et Systemes Complexes” CNRS UMR 7057, Uniiversite Paris Diderot – Paris 7, France	
<b>Участници:</b>	
Проф. Миглена Ангелова	УЧ
<b>Партньорска организация:</b>	
<b>Участници:</b>	

<sup>1</sup> Отбележете академичната длъжност, научната степен, име и фамилия на всеки участник като включите и участниците, които са работили по проекта не през целия период за изпълнение на проекта

<sup>2</sup> Отбележете дали участникът в колектива е млад учен (МУ), постдокторант (ПД), докторанти (ДО) или студенти (СТ), или учен от чужбина (УЧ).



***Постигнати резултати от изпълнението на проекта и кратък анализ на тяхната приложимост (до 1 стр. в рамките на полето по-долу)***

В резултат на проведените изследвания беше установено, че едновременното третиране на човешки белодробни аденокарциномни клетки със специфични комбинации на два антитуморни агенти, инхибиторът на сфингозин киназа 1 диметилсфингозин и алкилфосфохолинът милтефозин, индуцира синергичен цитотоксичен ефект, който беше потвърден чрез изчисляване на комбинационния индекс. Едновременното действие на тези два агента предизвиква значително намаляване на броя на туморните клетки, както и ясно изразени морфологични промени в тях. Ефектите от третирането на туморните клетки с двата антитуморни агента бяха анализирани чрез МТТ тест, DAPI оцветяване, активност на цитохром С редуктаза, проточна цитофотометрия и др. Комбинираното третиране причинява значителни апоптотични процеси и намаляване на пролиферативния маркер сфингозин-1-фосфат, в сравнение с индивидуалните третираня с всеки един от противораковите лекарства самостоятелно.

Известно е, че милтефозинът влияе на синтеза на холин-съдържащи фосфолипиди, включително сфингомиелин, но ние за първи път установихме, че той предизвиква намаляване на пролиферативния фактор сфингозин-1-фосфат. Ние предлагаме възможен механизъм, лежащ в основата на ефекта на милтефозин върху сфингозин киназа 1, включващ индуцирано от милтефозин инхибиране на протеин киназа С. Получените резултати са оригинални и показват, че милтефозинът понижава фосфорилирането на протеин киназа С, която е активатор на сфингозин киназа 1.

С помощта на цитофотометричен анализ беше установено, че комбинираните третираня са значително по-слабо токсични по отношение на здрави епителни клетки в сравнение с клетки от човешки белодробен аденокарцином.

В заключение, получените резултати демонстрират възможности за третиране на белодробни туморни клетки с по-ниски концентрации на двата антитуморни лекарства, диметилсфингозин и милтефозин, което е благоприятно, с оглед потенциалната им цитотоксичност по отношение на нормалните клетки. Проведените изследвания са принос в търсенето на нови антитуморни комплексни терапевтични подходи с цел оптимизация на терапевтичния ефект и максимална протекция на здравите тъкани.