



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ  
Катедра «Биология на развитието»



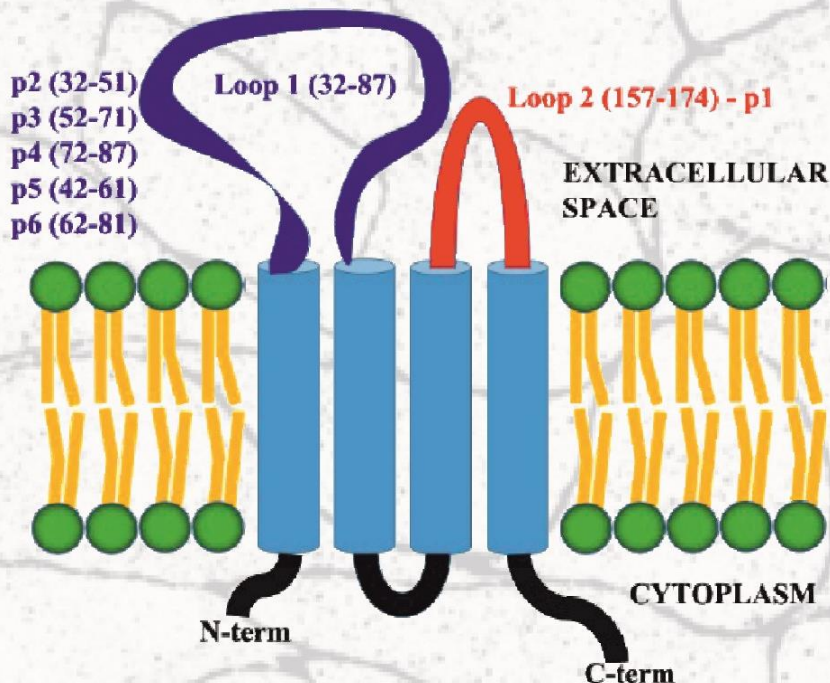
Десислава Иванова Колчакова

## ФУНКЦИОНАЛЕН АНАЛИЗ НА ПРОТЕИНА КЛАУДИН ПРИ ТУМОРНИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ

### АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд  
за присъждане на образователната и научна степен «доктор»

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,  
Професионално направление: 4.3 Биологически науки  
Научна специалност: Клетъчна биология



Научни ръководители:

проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов  
доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова

Пловдив, 2021 г.



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

Катедра «Биология на развитието»



**Десислава Иванова Колчакова**

**ФУНКЦИОНАЛЕН АНАЛИЗ НА ПРОТЕИНА КЛАУДИН  
ПРИ ТУМОРНИ КЛЕТЪЧНИ ЛИНИИ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователната и научна степен «доктор»

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

Професионално направление: **4.3 Биологически науки**

Научна специалност: **Клетъчна биология**

**Научни ръководители:**

*проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов*

*доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова*

**Пловдив, 2021 г.**

Дисертационният труд съдържа 106 страници, 2 таблици, 24 фигури и 174 литературни източника.

Експериментите, включени в настоящия дисертационен труд са проведени в лабораторията по Клетъчна биология към катедра «Биология на развитието», Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски».

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на катедрен съвет на катедра „Биология на развитието“ при Биологически факултет на ПУ „П. Хилендарски“ проведен на 20.05.2021 г.

Откритото заключително заседание на научното жури ще се състои на 22.07.2021 г. от 11:00 часа в Биологически факултет (гр. Пловдив ул. Тодор Самодумов № 2, Стария град).

Материалите по защитата са предоставени за свободен достъп на интересуващите се в библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски“.

**Научно жури:**

проф. д-р Василий Щерев Ишев, дм  
проф. д-р Валентин Иванов Турийски  
доц. д-р Анелия Веселинова Биволарска  
доц. д-р Еленка Стоилова Георгиева  
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

**Автор:** Десислава Иванова Колчакова

**Заглавие:**

Функционален анализ на протеина клаудин при туморни клетъчни линии

*Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2021 г.*

## 1. Въведение

Мембранната компартментализация при еукариотните клетки позволява да се постигне висока степен на специализация и независима регулация по отношение на различни клетъчни активности. Органите и тъканите при многоклетъчните организми включват различни бариери, които от една страна разграничават отделни пространства или течности, но от друга, осигуряват защита на организма срещу потенциално вредни външни агенти. Широка гама от различни болестни състояния при човека са пряко свързани с промени в епителните тъкани или свойствата на тези бариери. Дисфункцията на епителната бариера често допринася за прогресията на патологични състояния и тумори.

На клетъчно ниво, цитоплазмените мембрани не само отделят пространства, но също така си партнират при междуклетъчните взаимодействия в многоклетъчния организъм. Този тип взаимодействия се означават като междуклетъчни контакти. В зависимост от ролята на тези контакти, те могат да се групират като:

- междуклетъчни контакти за механично свързване, чрез които се осигурява обединяването на клетки в тъкани;
- контакти за пренос на информация от една клетка в друга;
- контакти, с които плътно се затваря междуклетъчното пространство, с което се препятства свободното дифундиране на вещества и се ограничава латералната дифузия на протеини в плазмалемата.

Междуклетъчните контакти се образуват на повърхността на клетките и в тяхното структуриране вземат активно участие цитоплазмената мембрана, екстрацелуларния матрикс, компонентите на субмембранната цитоплазма и цитоскелета. В цитоплазмената мембрана има голям брой интегрални протеини, влизащи в състава на апикалната и базалната страна на мембраната и съдействащи за клетъчната адхезия.

Плътните контакти са открити през 60-те години на XX век и са наречени още „*zonula occludens*”- участък от междуклетъчното пространство, в който мембраните на контактуващите клетки са максимално доближени една до друга и интегралните им протеини се срещат в определена точка, като по този начин затварят плътно междумембранното пространство. Този тип контакт има точков характер, защото на няколко места интегралните протеини от едната мембрана се свързват с тези от другата мембрана. Интегралните протеини, участващи в плътния контакт, в повечето случаи са разположени под формата на вериги, паралелни една на друга и спрямо апикалната повърхност на тънкочревната клетка. Увеличаването на плътността на тези вериги води до по-плътна връзка, което би намалило пропускливостта на контакта.

Това означава, че сложността на компонентите на плътния контакт е важна за структурата на епитела.

Протеините от семейството на клаудините са важни компоненти на плътните контакти, определящи бариерните свойства, полярността на клетките и парацелуларната пропускливост. Съвременни проучвания показват, че клаудините играят важна роля в клетъчната миграция и метастаза. По време на метастазирането често се наблюдават загуба на епителна/ендотелна цялост, нарушаване на плътните контакти и повишен парацелуларен транспорт, което осигурява пространство за придвижване на раковите клетки. Известно е, че при метастазиране, експресията на някои клаудини може да се увеличи или намали по специфичен за тъканите начин. Има данни, че свръхекспресията на клаудин-12 значително увеличава метастатичните свойства на човешки бронхиални епителни клетки. Този протеин представлява необичаен представител на семейството на клаудините, тъй като не съдържа класическия цитоплазмен PDZ домейн. Ролята на клаудин-12 за миграцията на раковите клетки през плътните контакти по време на метастазиране, както и за модулиране действието на вещества с противораков ефект, не е изяснена. *Затова, целта на настоящото проучване е да се изследва участието на клаудин-12 в процеса на клетъчна миграция, както и да се оцени възможността този протеин да се използва като специфична цел за регулиране на туморогенезата и инхибиращия ефект на вещества с антитуморно действие.*

## **2. Литературен обзор**

Литературният обзор включва следните основни раздели:

- 2.1. Плътни междуклетъчни контакти
- 2.2. Обща характеристика на клаудиновите протеини
- 2.3. Структура на клаудиновите протеини
- 2.4. Гени, кодиращи клаудиновите протеини и регулиране на тяхната експресия
- 2.5. Функции на клаудиновите протеини
- 2.6. Локализация и експресия на клаудин-12 в различни тъкани и органи
- 2.7. Структурни особености и функции на клаудин-12

## **3. Цел и задачи**

Целта на настоящия дисертационен труд е да бъде проучена ролята на клаудин-12 в процеса на клетъчна миграция, за да се оцени възможността този протеин да се използва като специфична цел за регулиране на туморогенезата, както и модулиране на инхибиращия ефект на вещества с антитуморно действие.

За осъществяване на така формулираната цел бяха поставени следните задачи:

- 1) Анализ на експресията на клаудин-12 при различни туморни клетъчни линии.
- 2) Проучване ролята на клаудин-12 при процесите на миграция на туморни клетки.
- 3) Изследване значението на клаудин-12 за клетъчната пролиферация и индукция на апоптоза.
- 4) Провеждане на конкурентно-инхибиторни тестове с пептиди, съответстващи на части от екстрацелуларните домейни на клаудин-12.
- 5) Анализ на антитуморното действие на вещества от групата на s-триазините чрез панел от *in vitro* тестове с клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии.
- 6) Определяне вътреклетъчното ниво на АТФ при клетки от клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии след култивиране в присъствието на триазини.
- 7) Оценка на морфологичните промени, настъпващи в клетъчните култури под влияние на третирането им с триазиновите вещества;
- 8) Проучване потенциалната роля на клаудин-12 за модулиране антитуморното действие на вещества от групата на s-триазините.
- 9) Анализ на получените резултати и формулиране на изводи.

## 4. Материали и методи

### 4.1. Реагенти и антитела

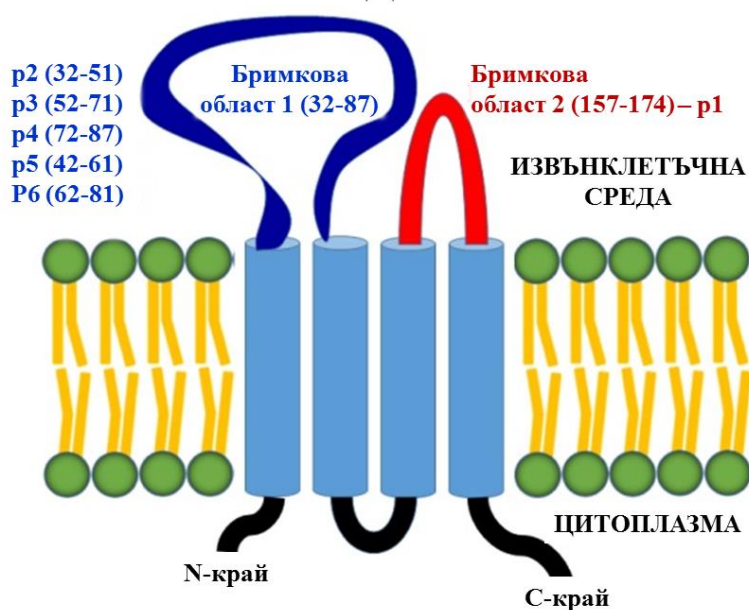
Всички реактиви, използвани при експериментите в настоящата дисертация, бяха произведени от специализирани и сертифицирани фирми. Преобладаващата част от тях бяха доставени от Merck KGaA (Дармщат, Германия). Следните шест синтетични пептиди бяха синтезирани от Schafer-N (Копенхаген, Дания):

- p1 - YNIHLNKKFEPVFSFDYA (Cldn-12 157-174)
- p2 - NWRKLRRLITFNRNEKNLTVY (Cldn-12 32-51)
- p3 - TGLWVKCARYDGSSDCLMYD (Cldn-12 52-71)
- p4 - TTWYSSVDQLDLRVLQ (Cldn-12 72-87)
- p5 - NRNEKNLTVYTGLWVKCARY (Cldn-12 42-61)
- p6 - DGSSDCLMYDTTWYSSVDQL (Cldn-12 62-81)

Аминокиселинната последователност на пептид p1 съответства на втория екстрацелуларен домейн на клаудин-12 (оцветен в червено на Фигура 1), докато пептиди p2, p3, p4, p5 и p6 съответстват на части от първия екстрацелуларен домейн на протеина (оцветен в синьо на Фиг. 1).

Annexin V-FITC и пропидиев йодид (PI) бяха доставени от Abcam. Мише моноклонално анти-CLDN12 антитяло (клон 2D8,) и козе анти-миши IgG-FITC антитяло, разпознаващо цялата молекула на IgG и козе анти-миши IgG (цяла молекула)-пероксидаза антитяло бяха закупени от Merck KGaA. Моноклонално анти-човешко CD11a/CD18-APC (LFA-1) антитяло (клон m24), анти-човешко CD62L-FITC (L-селектин) антитяло (клон DREG-56) и анти-човешко CD44-PE антитяло (клон BJ18), всички получени от мишки, бяха закупени от BioLegend®.

## К Л А У Д И Н – 1 2



**Фигура 1.** Модел на протеина клаудин-12, представящ екстрацелуларните домени и съответстващите им синтетични пептиди.

При част от експериментите, представени в настоящата дисертация, бе изследвана антитуморната активност на три вещества от групата на s-триазините (1,3,5-триазини) спрямо клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии. Наименованията на тези тест-реагенти са:

- Цианурова киселина (2,4,6-trihydro-1,3,5-triazine; 1,3,5-triazine-2,4,6-triol; Cyanuric acid /CA/);
- Трисхидроксиетилцианурова киселина (1,3,5-Tris-(2-Hydroxyethyl)-1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-Trione; 1,3,5-Tris(2-Hydroxyethyl) isocyanuric acid /THIC/);
- Трихлороизоцианурова киселина (1,3,5-Trichloro-2,4,6-triazinetriol; Trichloroisocyanuric acid /TCIC/);
- 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine /CDMT/).

Изброените вещества бяха доставени от Merck KGaA.

## 4.2. Клетъчни линии и условия за култивиране

При експериментите, проведени във връзка с настоящия дисертационен труд, бяха използвани *in vitro* култури от следните човешки клетъчни линии: A549 (ATCC CCL 185, NBIMCC 2404), Caco-2 (ECACC 86010202), CaOV (NBIMCC 1108), F – крайна клетъчна линия от човешки дермални фибробласти, изолирани от препуциум, HeLa (ATCC CCL 2, NBIMCC 164), HT-29 (ECACC 91072201), LS180 (ECACC 87021202), SK-Ner-1 (ATCC HTB 52, NBIMCC 1858), Jurkat E6.1 (ECACC 88042803).

Всички клетъчни линии, с изключение на F, бяха поръчани и доставени от Европейската колекция за клетъчни култури (ECACC,) или от Националната банка за индустриални микроорганизми и клетъчни култури (NBIMCC).

## 4.3. Имуноцитохимия и Western blot за детекция на клаудин-12

Клетки от клетъчните линии A549, Caco-2, CaOV, HT-29, LS180, SK-Ner-1, F и HeLa бяха заложени ( $1 \cdot 10^5$  клетки/ямка) върху стерилни покривни стъкла в 12-ямкови плаки и култивирани в обогатена среда DMEM (1 mL/ямка), използвайки инкубатор, който поддържа висока влажност, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. След 48 часа, клетките бяха промити два пъти с D-PBS и фиксирани с ледено студена смес от ацетон и метанол (1:1). След това клетките бяха оцветени за 30 минути с анти-CLDN12 антители при стайна температура, промити с D-PBS и инкубирани в продължение на 15 минути с 1 µg/mL разтвор на вторични анти-миши IgG-FITC антитела на тъмно. След трикратно промиване с D-PBS, експресията на клаудин-12 в изследваните клетъчни линии беше анализирана с помощта на флуоресцентен микроскоп.

За Western blot анализ на експресията на клаудин-12 клетки от избраните клетъчни линии (A549, LS180 и HeLa) бяха промити два пъти в студен D-PBS и лизирани с RIPA лизисен буфер (150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% натриев додецил сулфат, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0), съдържащ коктейл от протеазни инхибитори cOmplete™. Получените лизати бяха обработени с ултразвук в продължение на 20 секунди и центрофугирани при 6000g в продължение на 20 минути. След това супернатантите бяха филтрувани и концентрирани, използвайки 30 kDa и 10 kDa Amicon® Ultra-15 центрофужни филтри. Концентрациите на изолираните протеини бяха измерени на спектрофотометър NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтън, САЩ). Равни количества (30 µg) протеини (между 10–30 kDa), изолирани от трите клетъчни линии бяха използвани за протеинова гел електрофореза при неденатуриращи условия. Отделените фракции бяха електротрансферирани върху нитроцелулозна мембрана, което беше последвано от блокиране с 5% D-



PBS разтвор на обезмаслено сухо мляко в продължение на 1 час и инкубиране с антитела срещу клаудин-12 при 4°C за една нощ. След промиване с буфер, мембраната беше инкубирана с конюгирано с пероксидаза кози антимиши IgG (разреждане 1:2000) при стайна температура за 1 час. Имуноблотите бяха обработени с Pierce™ ECL Western Blotting Substrate в съответствие с инструкциите на производителя, за да бъде осъществена цветна реакция.

#### **4.4. *In vitro* тестове за анализ на цитотоксичност, антитуморна активност, клоногенна ефективност и клетъчна пролиферация**

За изследване на цитотоксичния и потенциален антитуморен ефект на триазини при клаудин-12-положителни и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии бяха проведени МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,4-diphenyltetrazolium bromide) и NR (Neutral red) колориметрични тестове, както и тестове за клоногенна ефективност.

#### **4.5. Тест за измерване концентрацията на АТФ**

HeLa, A549 и F клетки в концентрация  $0.5 \times 10^6$  клетки/ямка бяха заложени в 6-ямкови плаки и бяха инкубирани при стандартни условия за 24 часа. След това, към хранителната среда на клетките в култура бяха добавени 100 µg/mL TCIC за 24 часа. Впоследствие клетките бяха трипсинизирани, промити със стерилен D-PBS и лизирани. Количеството аденозин трифосфат, продуцирано от различните типове клетки след третиране с TCIC или CDMT, беше отчетено използвайки стандартен кит за измерване концентрацията на АТФ (ATP Determination Kit – A22066, Molecular Probes, Life technologies, САЩ).

Концентрацията на АТФ в експерименталните проби беше изчислена спрямо генерираната стандартна крива, според отчетената луминисценция при реакция с известно количество АТФ.

#### **4.6. Анализи на клетъчна миграция *in vitro***

За провеждане на тези изследвания бяха използвани клетки от клетъчните линии A549, LS180 и HeLa. Беше използвана следната методика:

1) 100 µL обогатена хранителна среда, съдържаща  $5 \times 10^5$  клетъчна суспензия беше добавена към горната камера на ямки от културална плака Corning® HTS Transwell®. Тези културални съдове съдържат поликарбонатна мембрана с 8 µm размер на порите в състава ѝ. Тя формира дъното на горна камера (подвижна приставка), която е налице във всяка ямка на културалната плака.

2) Клетките бяха инкубирани за 24 часа при 37°C в инкубатор, поддържащ висока влажност и 5% съдържание на CO<sub>2</sub>.

3) След края на инкубационния период клетъчните монослое в горните камери на ямките от културалната плака бяха третираны с моноклонално анти-CLDN12 антитяло (1 µg/mL) в продължение на 30 минути при 37°C, след това бяха промити три пъти със 150 µL DMEM без серум и инкубирани за още 24 часа в 100 µL безсерумен DMEM при 37°C във влажна атмосфера, съдържаща 5% CO<sub>2</sub>.

4) За последните 24 часа в долните камери на културалния съд бяха добавени 100 µL обогатена хранителна среда DMEM. Клетките, нетретираны с анти-CLDN12 антитяло, бяха използваны като контрола.

5) Мигриралите през мембраната на горната камера и достигнали дъното на ямките в културалния съд клетки бяха фиксирани в студен метанол и оцветени с 0.5% кристал виолет за 10 минути.

6) Всички мигрирали клетки бяха изследваны на инвертен светлинен микроскоп Inverso, оборудван с Si-3000 цифров фотоапарат и софтуер. Клетките във всяка ямка, съдържаща приставка с мембрана, бяха преброени. Бяха направени снимки при 200x общо увеличение по време на микроскопиране. Всички проби бяха заложены в трипликати.

За да анализираме миграцията на Jurkat клетки през плътните контакти на образувани монослое от адхерентни клетки, използвахме същия тип културална система, която е описана по-горе, с малки модификации. За да се избегне миграцията на адхерентни клетки през дъното на горната камера, ние използвахме Corning® HTS Transwell® 96 ямкови плаки с поликарбонатната мембрана, чиито пори имат размер 3 µm вместо 8 µm. След третиране с моноклонално анти-CLDN12 антитяло и промиване на формираните в горните камери монослое от клетки A549, LS180 или HeLa, бяха добавени Jurkat клетки (1×10<sup>6</sup> клетки/ямка), суспендирани в 150 µL безсерумна хранителна среда, и ко-култивирани за 24 часа при 37°C в CO<sub>2</sub> инкубатор с висока влажност. Клетките A549, LS180 и HeLa, нетретираны с анти-CLDN12 антитяло, служеха като контролни групи. Долните камери бяха изпълнены отново с обогатена хранителна среда DMEM, съдържаща 10% FBS. Мигриралите Jurkat клетки бяха снимани, преброени и използваны за анализ на поточен цитометър (флоуцитометричен анализ).

#### **4.7. Тест с конкурентно инхибиране за изследване на клетъчна миграция**

За да оценим ролята на клаудин-12 протеина за миграция на Jurkat клетки през монослоеве от адхерентни клетки (A549, LS180 или HeLa), извършихме отново миграционен тест. Беше използвана гореописаната методика за изследване миграцията на Jurkat клетки, но без третиране на

монослоеве с анти-CLDN12 антитяло. При тези експерименти, в горните камери на културална плака Transwell® с мембрани с размер на порите 3 µm, към ко-културата от Jurkat и адхерентни клетки бяха добавени синтетични пептиди (p1, p2, p3, p4, p5, p6), представляващи части от извънклетъчните домейни на протеин клаудин-12. Имитирайки извънклетъчните домейни на клаудин-12 в плътните контакти на монослоеве, образувани от клетки A549 и LS180, тези пептиди ще се конкурират за свързване с мигриралите клетки Jurkat. Ако нашата хипотеза за участие на протеин клаудин-12 в миграцията по време на метастазирание е вярна, броят на мигриралите клетки Jurkat през плътните контакти ще бъде намален чрез конкурентно инхибиране. Всеки пептид беше тестван в три отделни проби в крайна концентрация 5 µg/mL. Ко-култури от Jurkat и адхерентни клетки, заложи на Transwell® плаки без пептиди, бяха използвани като контроли.

#### **4.8. Анализи, базирани на поточна цитометрия (FACS)**

Контролните Jurkat клетки, както и мигриралите Jurkat клетки (след ко-култивиране с изследваните адхерентни клетки) бяха събрани и промити с FACS буфер (D-PBS, съдържащ 5% фетален телешки серум и 0.05% NaN<sub>3</sub>). След това клетките бяха оцветени с FITC-конюгирани анти-човешки CD62L (L-селектин), APC-конюгирани анти-човешки CD11a/CD18 (LFA-1) и PE-конюгирани анти-човешки CD44 антители за 30 минути при 4°C на тъмно. След това клетките бяха промити два пъти с FACS буфер и анализирани чрез поточна цитометрия, използвайки инструмент Cytomics FC500 (Beckman Coulter, САЩ). Нивата на изследваните биомаркери бяха сравнени между контролните и мигриралите Jurkat клетки.

За да проучим дали антителата срещу CLDN12 могат да предизвикат апоптотична клетъчна смърт, проведохме оцветяване с анексин V-FITC и пропидиев йодид (PI), последвано от поточен цитометричен анализ.

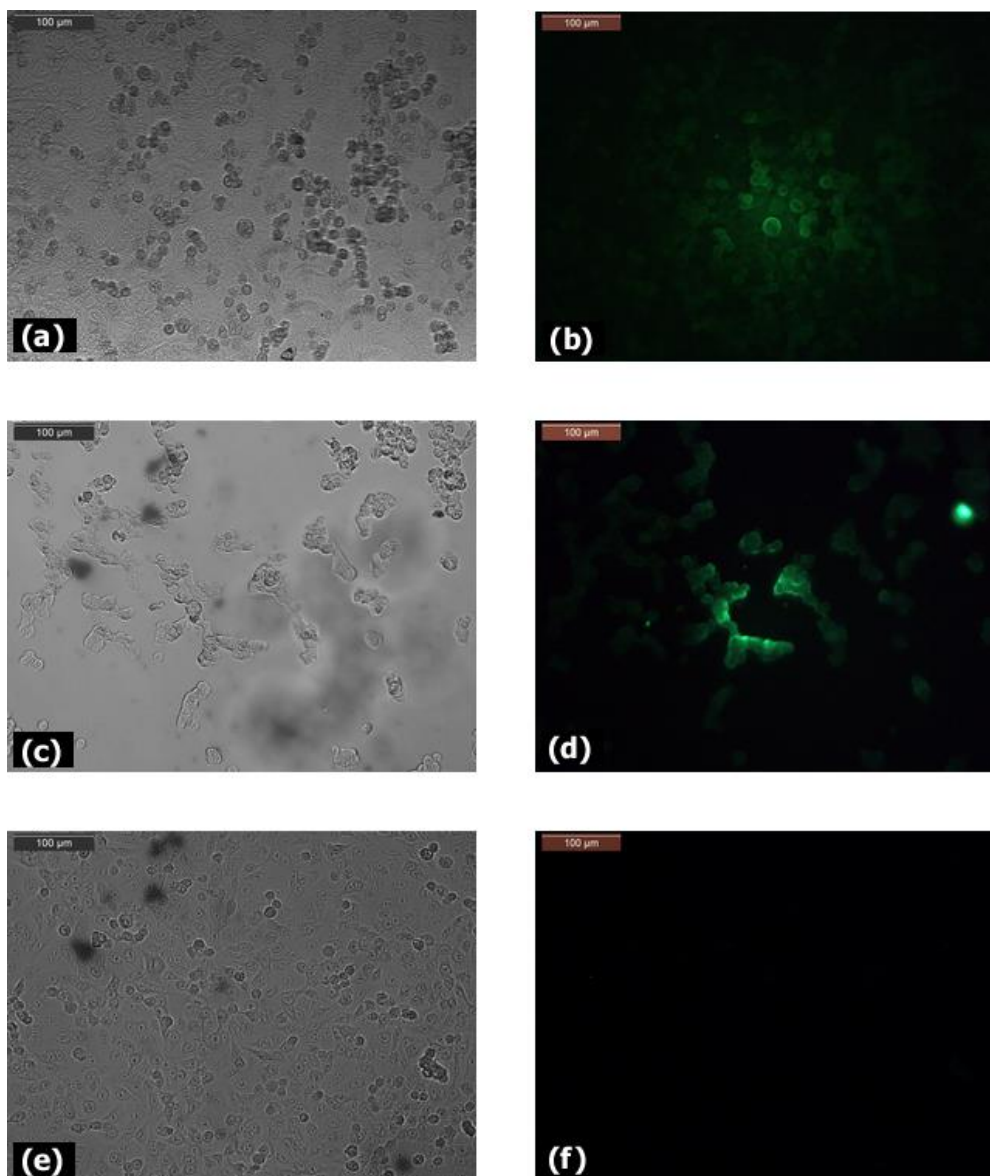
#### **4.9. Статистически анализ**

При всички експерименти пробите бяха изследвани в трипликати (три еднакви варианта) и всички данни бяха представени като средни стойности ± SE. За сравнение на непараметричните данни за статистическа значимост бяха приложени U-тест на Mann-Whitney или Kruskal-Wallis с помощта на програмата StatView (SAS Institute). Стойностите на  $p < 0.05$  се считат за значими (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Всички резултати бяха сравнени с тези от контролите.

## 5. Резултати

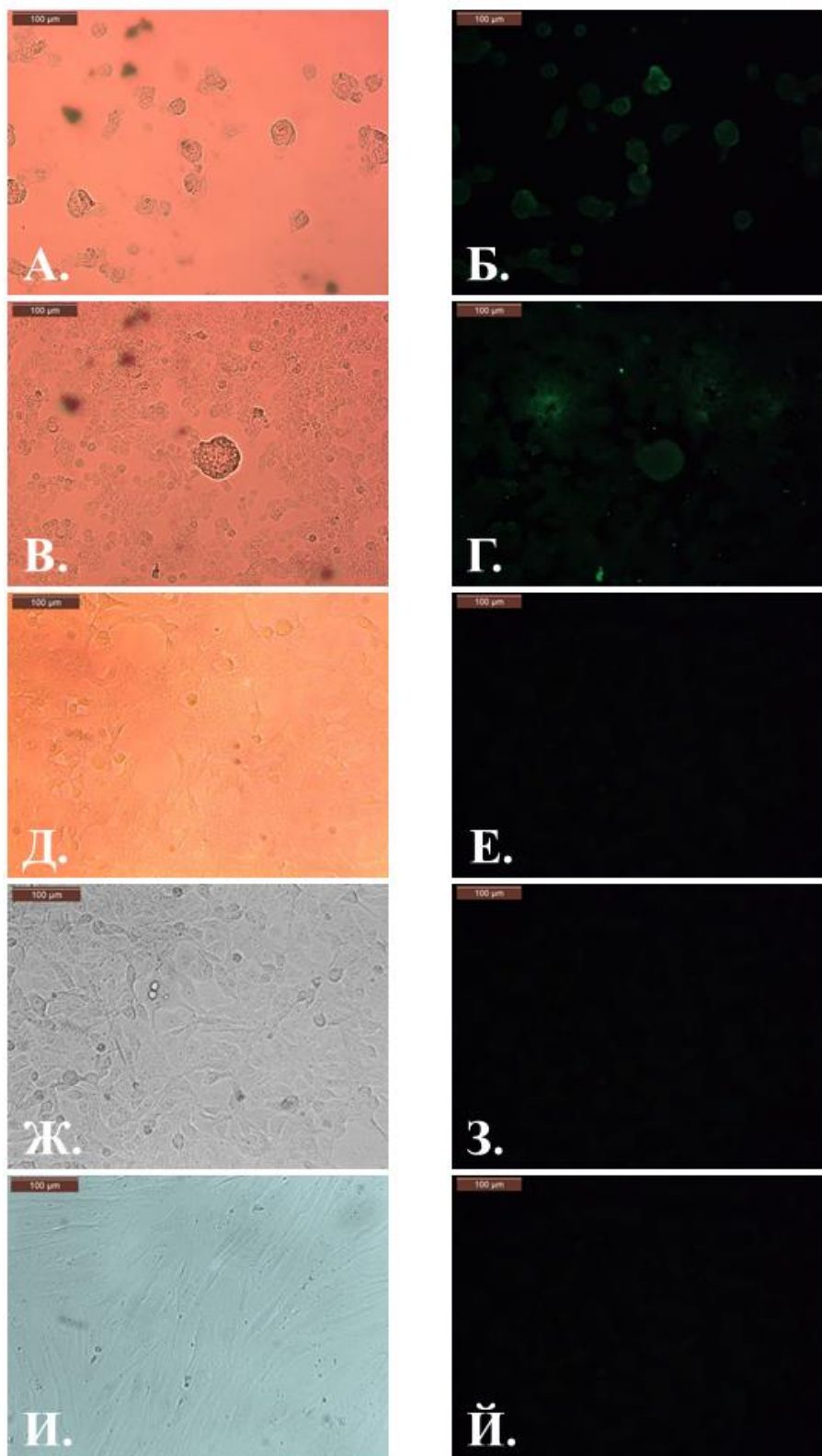
### 5.1. Експресия на клаудин-12

За да бъде избран подходящ *in vitro* модел за настоящото изследване, бяха тествани няколко човешки клетъчни линии (Caco-2, CaOV, LS180, HT-29, A549, HeLa, F, SK-Nер-1) за експресия на клаудин-12. Резултатите от имуноцитохимичното изследване за експресията на CLDN12 са представени на Фигура 2 и Фигура 3.



**Фигура 2.** Експресия на клаудин-12 в клетки A549 (a, b), LS180 (c, d) и HeLa (e, f), култивирани в продължение на 48 h (a, c, e – микроскопия в светло поле; b, d, f - флуоресцентна микроскопия).

След фиксиране клетките бяха оцветени с пречистено моноклонално анти-CLDN12 антитяло и FITC-конюгиран вторичен анти-миши IgG. (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021))

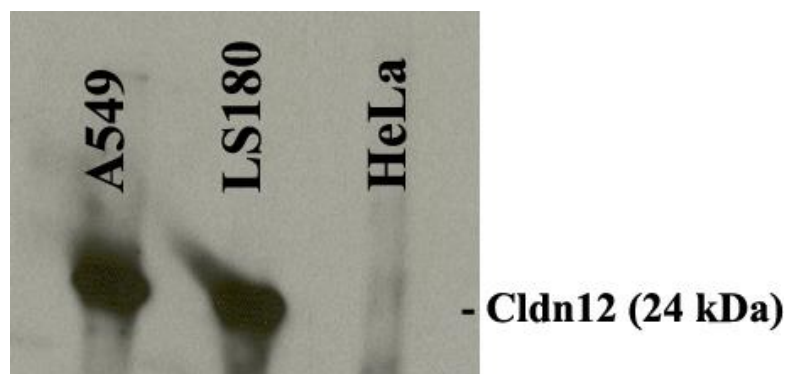


**Фигура 3.** Експресия на клаудин-12 в клетки CaCo-2 (А., Б.), HT-29 (В., Г.), CaOV (Д., Е.), SK-Нер-1 (Ж., З.) и F (И., Й.).

Клетките бяха култивирани в продължение на 48 часа (А., В., Д., Ж., И. – микроскопия в светло поле; Б., Г., Е., З., Й. - флуоресцентна микроскопия). След фиксиране пробите бяха оцветени с пречистено моноклонално анти-CLDN12 антитяло и FITC-конюгиран вторичен анти-миши IgG.

Базирайки се на тях и имайки предвид, че този протеин се експресира предимно в плътните контакти на епитела, в следващите експерименти бяха включени две експресиращи клаудин-12 клетъчни линии (Фигура 2, a-d) с различен произход - A549 (алвеоларни епителни клетки, получени от белодробна карциномна тъкан) и LS180 (епителни клетки, получени от карцином на дебелото черво) и една неекспресираща клаудин-12 клетъчна линия с епителен произход (HeLa) като отрицателна контрола (Фигура 2, e-f) Освен избраните клетъчни линии, беше установено, че клетките Сасо-2 и НТ-29 също експресират клаудин-12, но отчетеният при тях сигнал беше по-слаб (Фигура 3, А.-Г.). Решихме да използваме клетъчната линия LS180 вместо Сасо-2 или НТ-29 клетки, тъй като клетките LS180 се отличават с възможност за продукция на муцин, което ги определя като по-специфичен *in vitro* модел за интестинален епител. Клетъчните линии SK-Нер-1, F и СаOV не показаха експресия на клаудин-12 (Фигура 3, Д.-Й.).

За да потвърдим резултатите от имунофлуоресцентните изследвания, проведехме Western blot анализ с клетки от трите избрани клетъчни линии (A549, LS180 и HeLa). Получените резултати потвърдиха експресията на клаудин-12 при A549 и LS180 клетки, както и липсата на експресия на протеина при HeLa клетки (Фигура 4). Те подкрепиха данните от предходните имуноцитохимични изследвания, което категорично обоснова избора на клетъчни линии при следващите проучвания, свързани с функционален анализ на клаудин-12.



**Фигура 4.** Western blot анализ за експресия на клаудин-12 при A549, LS180 и HeLa клетки. (Фигурата е от Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).)

## **5.2. Значение на клаудин-12 за миграцията и разпространението на туморни клетки**

За да оценим дали клаудин-12 има роля за миграцията и метастазирването на туморни клетки, експресиращи този протеин, бяха проведени *in vitro* тестове за клетъчна миграция, съчетани с третиране с антитела срещу клаудин-12. По този начин може да бъде оценено дали

свързването, съответно блокирането на CLDN-12 с антитела повлияват миграцията на клетки, експресиращи този протеин (A549 и LS180).

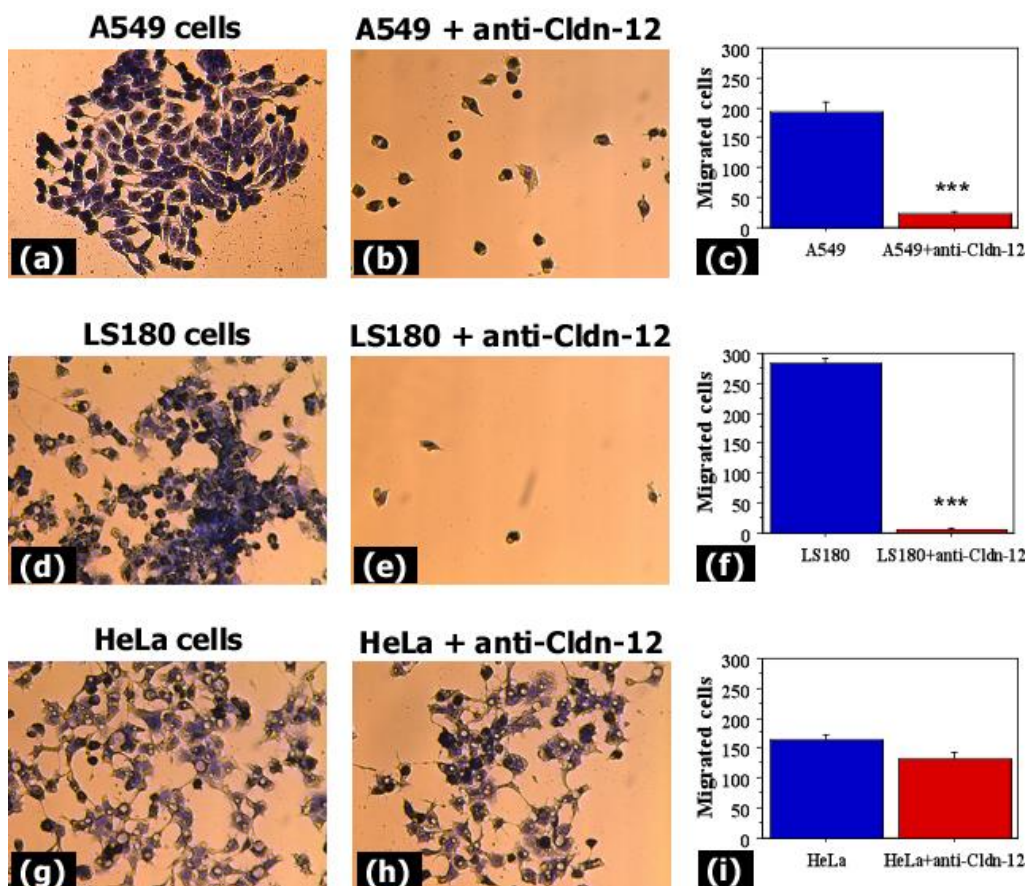
За осъществяване на тези тестове бяха използвани културални плаки, съдържащи приставка с мембрана (горна камера) във всяка ямка. Мембраната, която формира дъното на горната камера във всяка ямка, съдържа пори с размер 8  $\mu\text{m}$ . През тях могат да преминат клетки, способни да мигрират. Резултатите от проведените експерименти са представени на Фигура 5. Те показват значително намаляване на броя на мигриралите през мембраната клетки A549 и LS180 след третиране с антитела срещу клаудин-12 в сравнение с клетки от същите клетъчни линии, които не са третирани с анти-CLDN-12 антитела. Средният брой на мигриралите клетки A549 с и без третиране с антитела, беше съответно  $23 \pm 4$  и  $193 \pm 17$  клетки (Фигура 5, a-c). За клетъчната линия LS180 тези стойности бяха  $6 \pm 3$  клетки за третираните с антитела култури и  $283 \pm 8$  клетки за нетретираната проба (Фигура 5, d-f). Получените данни не показаха значителна разлика в способността за миграция между третираните с анти-клаудин-12 антитела ( $133 \pm 10$ ) и нетретираните ( $165 \pm 7$ ) HeLa (контролни) клетки (Фигура 5, g-i).

Тези резултати дават основание да бъде предположено, че клаудин-12 в състава на плътните контакти, участва в миграцията на клетки, експресиращи този протеин.

### **5.3. Роля на клаудин-12 за виталността и пролиферацията на експресиращи го туморни клетки**

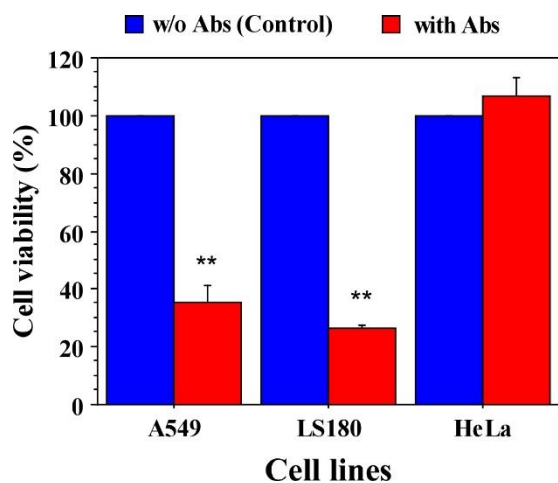
В допълнение към тестовете за клетъчна миграция бяха проведени проучвания за анализ на ефекта на антителата срещу клаудин-12 върху клетъчната жизнеспособност (съответно клетъчна пролиферация). За целта бяха осъществени MTT тестове с избраните три клетъчни линии, използвайки същата стратегия за третиране с антитела. Както е показано на Фигура 6, третирането с антитела води до значително намаляване на клетъчната виталност, съответно и на пролиферацията на клаудин-12 експресиращите A549 и LS180 клетки в сравнение с контролите. Такъв ефект не бе отчетен при клаудин-12-отрицателните HeLa клетки. След 48 часа, виталността при клетките A549 намалява до 35.47%, а при клетките LS180 - до 26.42% (Фигура 6). MTT тестовете демонстрират, че антителата срещу клаудин-12 потискат клетъчната виталност и пролиферация.

За да определим дали намалената жизнеспособност на третираните с анти-CLDN-12-антитела клетки се дължи на апоптоза или некроза, проведохме анализи, базирани на поточна цитометрия. Двойното оцветяване с анексин-V FITC и пропидиев йодид ясно показва, че антителата срещу клаудин-12 индуцират апоптоза в клетки A549 (8,85%) и LS180 (25,3%) (Фигура 7).



**Фигура 5.** Въздействие на клаудин-12 върху миграционните способности на ракови клетки, експресиращи клаудин-12.

A549, LS180 и HeLa клетки бяха третирани с анти-CLDN12 антитяло и култивирани на Transwell® плаки за оценка на способността им за миграция в сравнение с нетретирани клетки. В края на тестовите беше проведено оцветяване на клетките с 0.5% кристал виолет (a, b, d, e, g, h). Резултатите от сравнителния анализ (c, f, i) са представени като средна стойност (± стандартна грешка на средната стойност). \*\*\* показва  $p < 0,001$ . (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).)

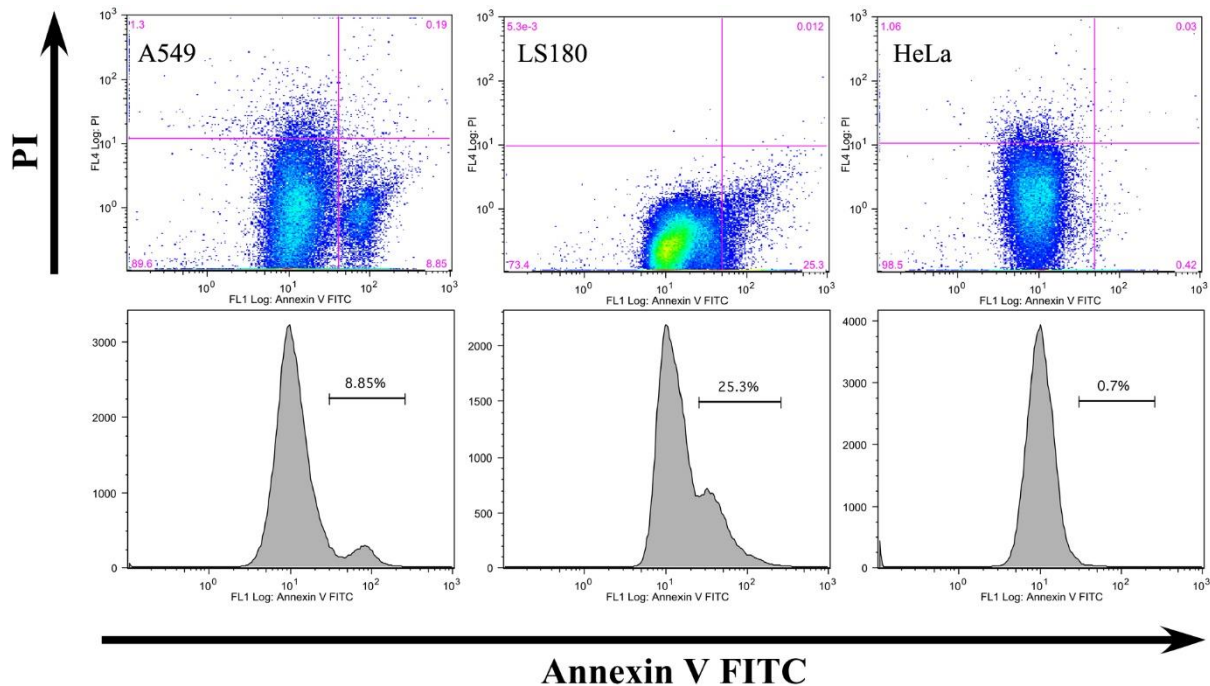


**Фигура 6.** Въздействие на клаудин-12 върху пролиферацията на ракови клетки, експресиращи клаудин-12.

Резултатите са представени като процент жизнеспособни клетки в сравнение с контролата (нетретирани клетки), изчислени на база на трикратни повторения. \*\* показва  $p < 0.01$ . (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).)



Вероятно това действие се дължи на блокиране на клетъчното делене след свързване с клаудин-12 на клетъчната повърхност. HeLa клетките не бяха засегнати (Фигура 7). Тези данни предполагат, че инхибирането на клетъчната пролиферация и миграцията на клетки, експресиращи клаудин-12, се дължи на апоптотична клетъчна смърт, предизвикана от свързването на антитела срещу CLDN12.



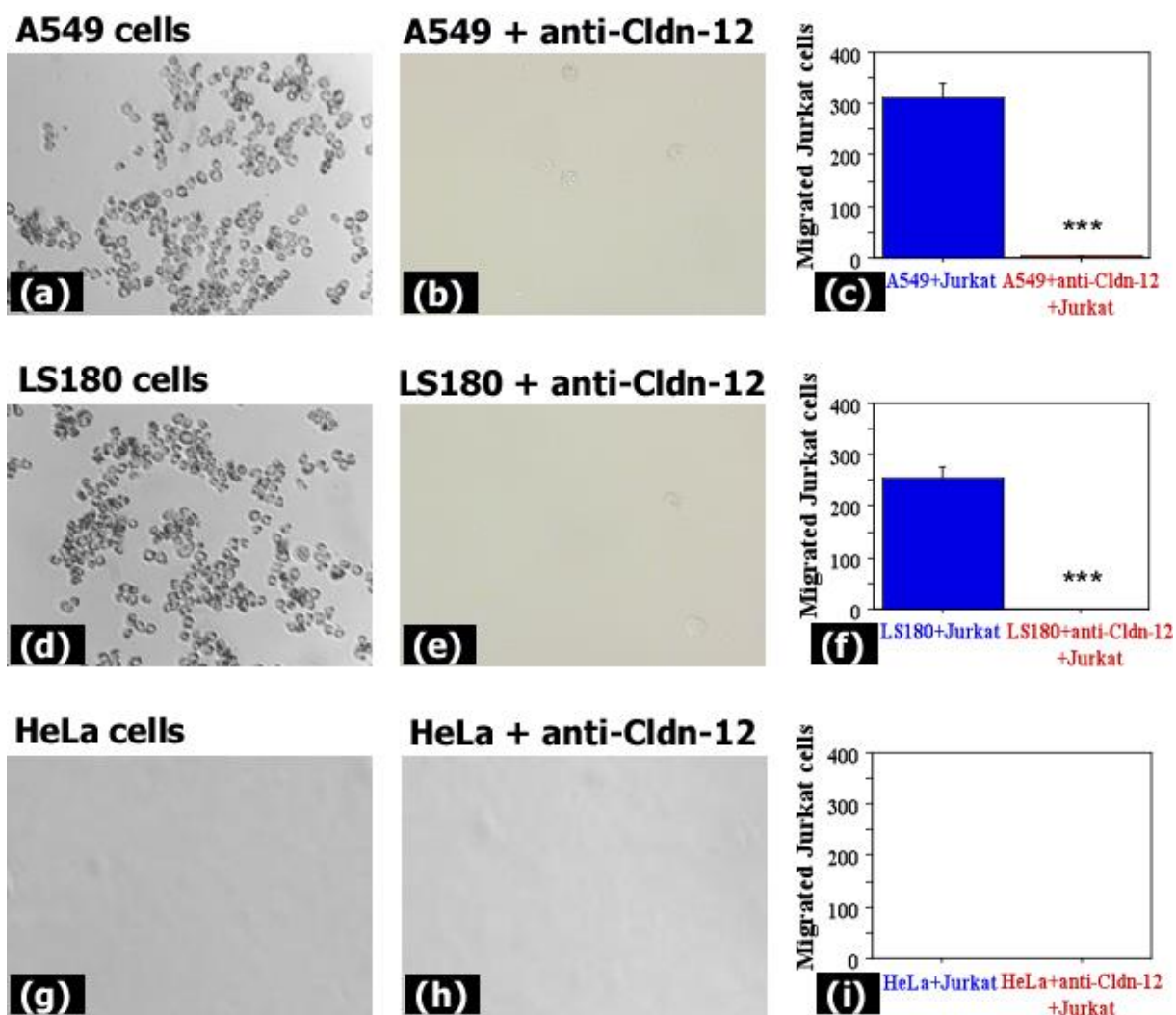
**Фигура 7.** Апоптотични ефекти на анти-CLDN12 антитела спрямо A549, LS180 и HeLa клетки.

Клетките бяха третирани с анти- CLDN12 антитела (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) за 24 часа, след което бяха оцветени с анексин V-FITC и пропидиев йодид (PI). Хистограмите на фигурата показват процент апоптотични клетки при всяка изследвана проба. (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021)).

#### 5.4. Значение на клаудин-12 за миграцията на клетки Jurkat през монослоевете от карциномни клетки

За да бъде проучено участието на клаудин-12 в процеса на метастазиране, бяха проведени *in vitro* тестове за клетъчна миграция, използвайки Transwell<sup>®</sup> плаки. За разлика от предходните анализи, при тези експерименти бяха използвани плаки, чиито горни камери съдържат мембрани с размер на порите 3  $\mu\text{m}$ . През тях не могат да преминат A549, LS180 или HeLa клетки. Втората особеност на тези експерименти е свързана със залагане на ко-култура от адхезивни клетки (A549, LS180 или HeLa) и Jurkat клетки (Фигура 8).

## Migrated Jurkat cells after co-culture with:



**Фигура 8.** Въздействие на клаудин-12 върху миграционните способности на клетки Jurkat.

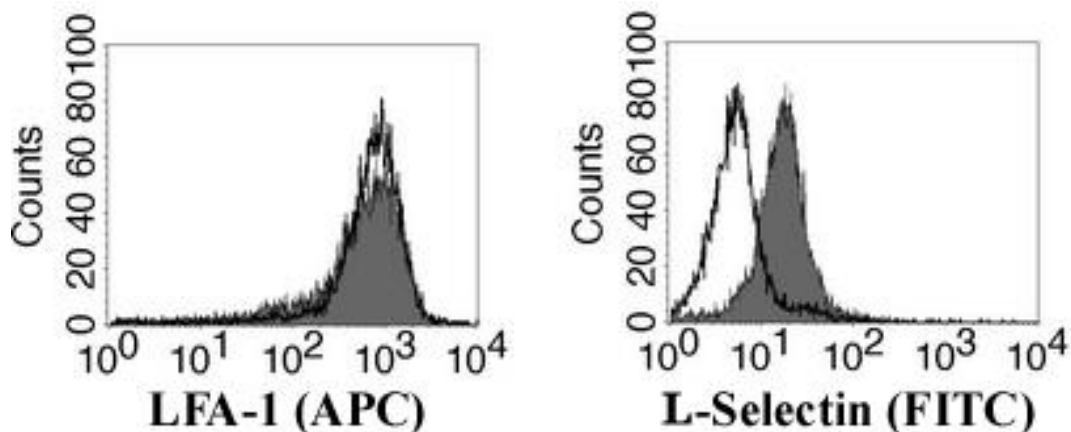
Монослоеве от клетки A549, LS180 и HeLa бяха третираны с анти-CLDN12 антитяло и култивирани съвместно с Jurkat клетки. Transwell® плаки бяха използвани за оценка на миграцията на Jurkat клетки през формираните монослоеве. Бяха снимани дъната на ямките, където се разполагат мигриралите клетки (**a, b, d, e, g, h**). Резултатите от сравнителния анализ (**c, f, i**) са представени като средна стойност  $\pm$  стандартна грешка на средната стойност. \*\*\* показва  $p < 0.001$ . (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).)

Резултатите разкриха, че клетките Jurkat са в състояние да мигрират най-вече през слоевете от клетки, експресиращи клаудин-12 (A549 и LS180) (Фигура 8, a,d). Но ако клетъчните слоеве бъдат предварително третираны с антитела срещу клаудин-12, миграцията на Jurkat клетките бива инхибирана (Фигура 8, b,e). Средният брой на мигриралите Jurkat клетки през A549 и LS180 клетки беше съответно  $310 \pm 30$  (Фигура 8, c) и

254±21 (Фигура 8, f). При ко-културата HeLa-Jurkat не бяха отчетени мигрирали Jurkat клетки (Фигура 8, g-i). Тези резултати потвърдиха, че клаудин-12 участва в миграцията на клетките по време на метастазиране.

### 5.5. Фенотип на мигриращите клетки Jurkat

За да бъде изследван фенотипа на мигриращите клетки Jurkat беше проведен флуоцитометричен анализ за експресия на LFA-1 и CD62L преди ко-култивиране с клетките A549, LS180 или HeLa и след анализ на миграцията. Както може да се види на Фигура 9, Jurkat клетки конститутивно експресират интегрин LFA-1 (преди и след миграция), докато експресията на L-селектин (CD62L) се индуцира след ко-култивиране с клетки A549 или LS180. Тези резултати предполагат, че за миграция през плътните контакти, клетките Jurkat вероятно използват LFA-1 или CD62L или и двете молекули. Клетките Jurkat не експресират CD44 гликопротеин (данните не са показани).



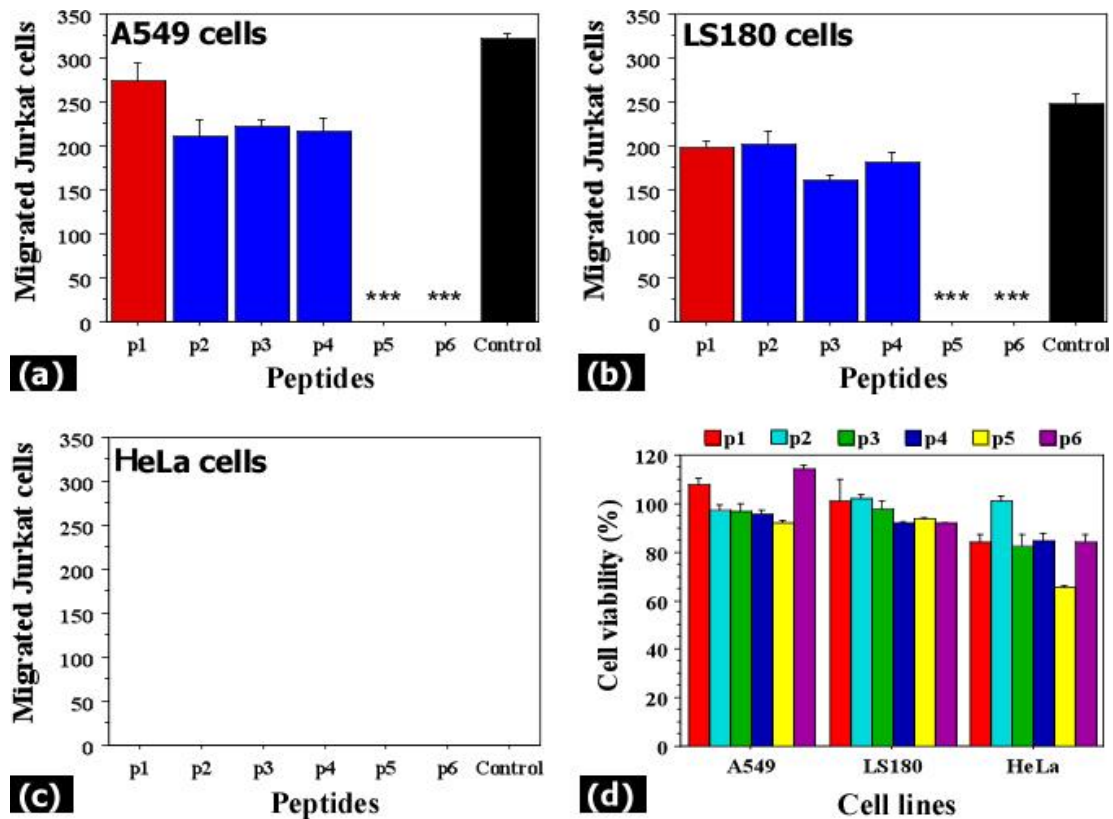
**Фигура 9.** Поточен цитометричен анализ на Jurkat клетки, отчитащ експресия на LFA-1 и L-селектин.

Фигурите представят резултати от изследване на мигрирали Jurkat клетки (сиви хистограми) и контролни Jurkat клетки (неоцветени хистограми), които не са култивирани съвместно с A549, LS180 или HeLa монослое. Клетките бяха оцветени с анти-човешки CD11a/CD18 APC-конюгирани (за LFA-1) и анти-човешки CD62L FITC-конюгирани (за L-селектин) антитела. Данните са от един представителен експеримент. (Фигурата е част от публикацията *Kolchakova et al., 2021, Biomolecules, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).*)

### 5.6. Роля на екстрацелуларните домени на клаудин-12 за миграция през плътните контакти

За да изследваме ролята на двата екстрацелуларни домена на клаудин-12 за клетъчната миграция през плътните контакти бяха използвани 6 синтетични CLDN12 пептида. Тяхната аминокиселинна последователност съответства на части от извънклетъчните бримкови региони на клаудин-12 (описани в глава 4. Материали и методи, подточка 4.1.). Целта на

изследването беше да бъде определена способността на синтетичните пептиди да инхибират миграцията на ракови клетки през плътните контакти. Отново бяха проведени експерименти с ко-културални системи на Transwell® плаки, но вместо анти-клаудин-12 антитела, използвахме синтетични клаудин-12 пептиди (Фигура 10).



**Фигура 10.** Ефекти на синтетични клаудин-12 пептиди.

Способност за миграция на Jurkat клетки след инкубиране със синтетични клаудин-12 пептиди – графики (a-c).

Резултатите са представени като средни стойности от трикратно повторение на всяка проба ( $\pm$  стандартна грешка на средната стойност). \*\*\* означава  $p < 0.001$ .

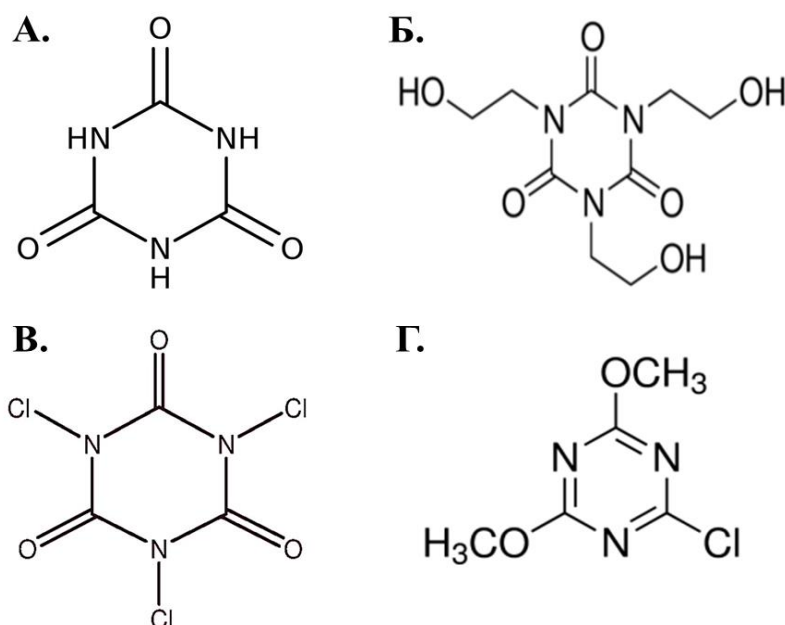
Ефекти на синтетичните клаудин-12 пептиди върху A549, LS180 и HeLa клетки – графика (d). Резултатите са представени като процент оцелели клетки, изчислен спрямо данните от нетретираните с пептиди контроли (средни стойности от трикратно повторение на всяка проба ( $\pm$ SEM)). (Фигурата е част от публикацията Kolchakova et al., 2021, *Biomolecules*, 11 (5) (Kolchakova et al., 2021).)

Получените резултати показват, че два от използваните пептиди (p5 и p6) напълно инхибират миграцията на Jurkat клетки през A549 (Фигура 10, a) и LS180 клетъчни слоеве (Фигура 10, b). Въпреки, че другите клаудин-12 пептиди (p1, p2, p3 и p4) леко намаляват миграцията на Jurkat клетки в сравнение с нетретираната с пептиди контрола (означена с черни стълбове на графики a,b,c), това инхибиране не е значително (Фигура 10).

Резултатите предполагат, че Jurkat клетките мигрират през плътните контакти чрез свързване с клаудин-12 и по-точно с първия извънклетъчен домейн на протеина, тъй като пептидите p5 и p6 съответстват на части от този домейн. Пептидът p1 (червени ленти), който представлява втория извънклетъчен домейн, не инхибира миграцията на Jurkat клетките. Тези данни предполагат, че вторият извънклетъчен домейн на клаудин-12 не участва във взаимодействията, медиращи миграцията през плътните контакти.

Наред с проучванията върху ролята на клаудин-12 за клетъчната миграция бяха проведени изследвания за антитуморна активност на вещества от групата на s-триазините спрямо клаудин-12-експресиращата клетъчна линия A549 и туморни клетъчни линии, които не експресират клаудин-12. При тези експерименти бяха включени по-голям брой клаудин-12-негативни клетъчни линии, за да бъде проучено едновременно както общото цитотоксично и антитуморно действие на тест-веществата, така и значението на клаудин-12 за това действие.

Първоначално, за тези изследвания бяха подбрани три вещества (Фигура 11, А,Б,В) – цианурова киселина и две производни (трисхидроксиетилизоцианурова киселина и трихлороизоцианурова киселина), от които TCIS демонстрира селективен антитуморен ефект. Впоследствие към изследванията бе включен още един триазин (CDMT) (Фигура 11, Г), който оказва силен цитотоксичен и антитуморен ефект.



**Фигура 11.** Химични структури на s-триазини.

**А.** цианурова киселина, **Б.** трисхидроксиетилцианурова киселина, **В.** трихлороизоцианурова киселина, **Г.** 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин.

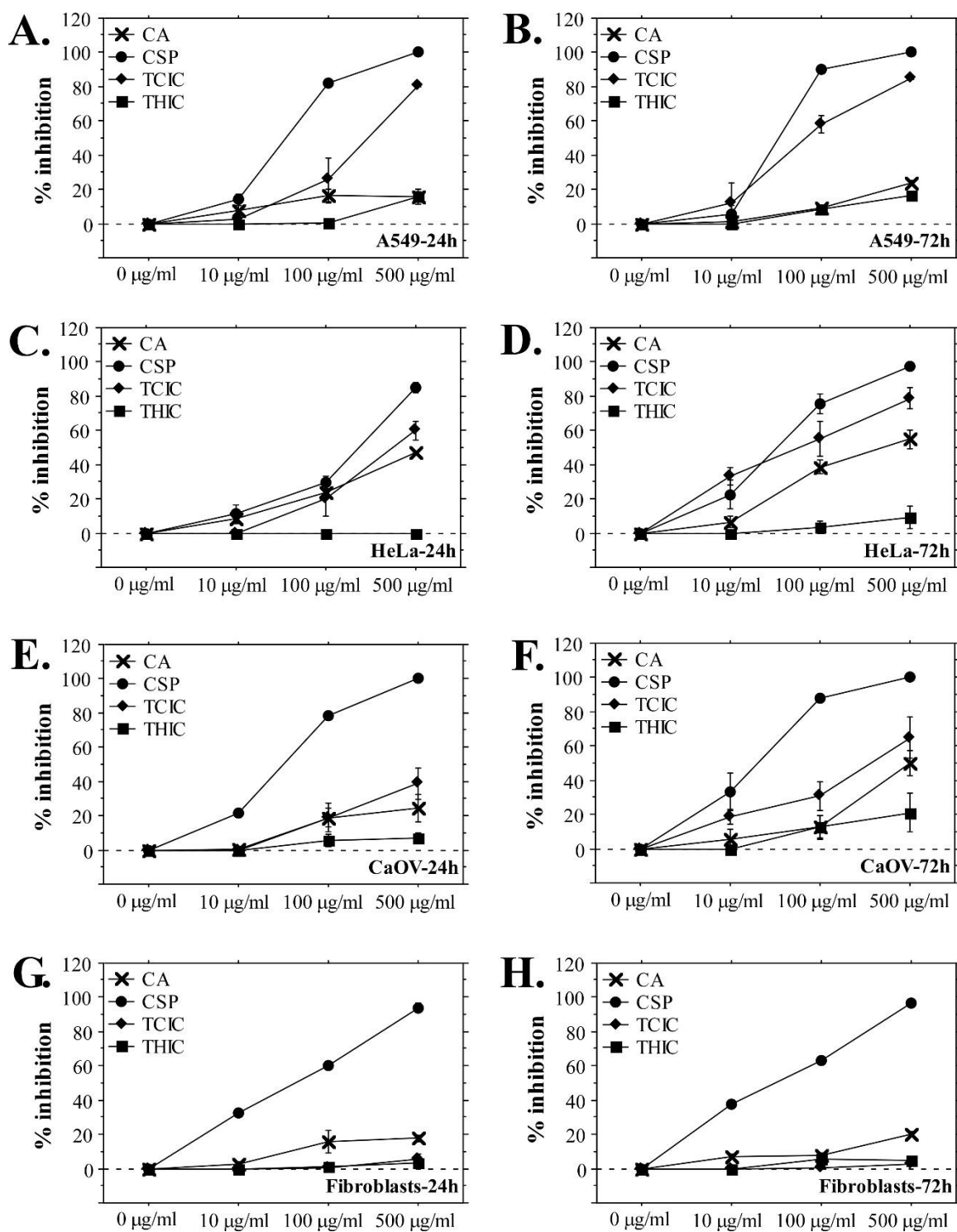
### **5.7. *In vitro* цитотоксичност и антитуморна активност на с-триазини спрямо клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-неекспресиращи клетъчни линии**

При това проучване бяха използвани четири човешки клетъчни линии. Три от тях са получени от пациенти с различни видове неопластични лезии. Една от използваните клетъчни линии е нетуморна, установена от нормални дермални фибробласти. Този панел от различни типове клетки позволява оценка на общ цитотоксичен ефект, както и потенциална антитуморна активност. Заедно с това, може да се направи сравнение между клаудин-12-експресиращата клетъчна линия A549 и три клетъчни линии, които не експресират клаудин-12. В тези експерименти циклоспорин А, антинеопластичен и имуносупресивен агент, служеше като положителна контрола със силен цитотоксичен ефект. Клетки, култивирани за същия период от време в стандартна хранителна среда представляваха нетретираната контрола. Определени бяха IC<sub>50</sub> стойности за 72-часовия период на експозиция (Таблица 1).

Резултатите, получени при проведените МТТ и NR *in vitro* тестове, са представени на Фигура 12 и Фигура 13.

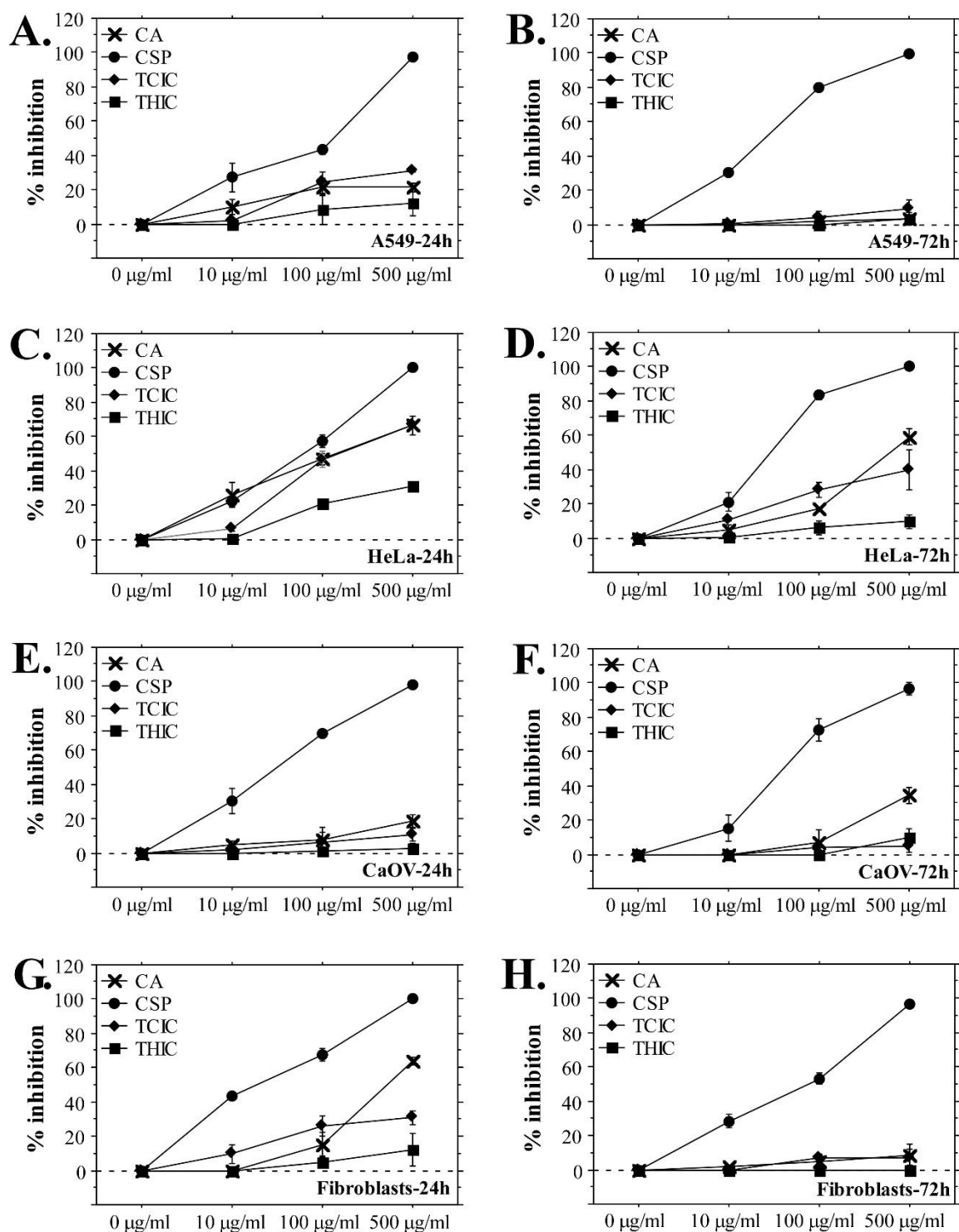
Данните от МТТ анализа показват зависими от концентрацията на тест-веществата и времето на експозиция отговори на клетките спрямо третиране с СА, ТНІС и ТСІС. Процентът инхибиране при клаудин-12-отрицателните туморни клетъчни линии (CaOV, HeLa) се увеличи след по-продължително третиране с триазини – 72 часа (Фигура 12, В,D,F). За разлика от тях, нормалните фибробласти показваха много по-ниско ниво на инхибиране (средно 20%, 5% и 3% за 24 часа експозиция към СА, ТСІС и ТНІС, съответно), което не се увеличи с нарастване времето на инкубация. В допълнение, данните от NR тестовете показват дори противоположната тенденция – инхибиторните ефекти на СА и ТСІС намаляват петкратно и десетократно по време на по-дългия тест-период (Фигура 13, G,H).

Като цяло, инхибиране на развитието на фибробластната култура се наблюдаваше след третиране с СА и ТСІС, а третирането с ТНІС не оказва токсичен ефект. Токсичен ефект при нетуморната клетъчна линия F бе отчетен чрез NR тест, което предполага насочена към лизозомите токсичност. Клетките обаче бяха в състояние да преодолеят негативното влияние, защото след по-продължително третиране с триазини (72 часа) бе отчетен по-нисък процент инхибиране (Фигура 13, H).



**Фигура 12.** Инхибиторни ефекти на СА, THIC и TCIC, отчетени чрез МТТ тест.

**A, C, E, G.** A549, HeLa, CaOV клетки и фибробласти бяха култивирани за 24 часа в хранителна среда, съдържаща триазини, след което изследвани чрез МТТ тест; **B, D, F, H** – резултати от МТТ тестове с A549, HeLa, CaOV клетки и фибробласти, третирани с триазини за 72 часа. Данните включват  $\pm$ SEM. CSP-циклоспорин А. (Фигурата е от публикацията на Batsalova et al., 2018, TFMO 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).)



**Фигура 13.** NR тестове с клаудин-12-отрицателни и клаудин-12-експресиращи клетъчни линии, третирани с s-триазини.

A, C, E, G. A549, HeLa, CaOV клетки и фибробласти след 24-часово третиране с триазини; B, D, F, H. A549 и клаудин-12-неекспресиращи клетки след 72-часово култивиране в присъствие на триазини. Данните представят  $\pm$  SEM. CSP-циклоспорин А. (Фигурата е от публикацията на Batsalova et al., 2018, TFMO 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).)



От друга страна, по-силни инхибиторни ефекти на триазините срещу ракови клетъчни линии бяха отчетени чрез МТТ тестове. Само HeLa клетките показаха по-висок процент инхибиране при NR анализите (до 45% за 72-часово излагане на TCIC, 65% след 72 h лечение с CA, 10% за 72 h експозиция на THIC) – данни, сходни с резултатите от МТТ тестовете (Фигура 12, C,D; Фигура 13, C,D). Всъщност сред всички клетъчни линии HeLa демонстрираха най-висока чувствителност към третиране с триазини. При другата туморна клетъчна линия, която не експресира клаудин-12 (CaOV), не бе отчетено толкова високо ниво на токсичност. Както клаудин-12-експресиращите A549 клетки, така и CaOV клетките показаха по-ниски нива на инхибиране след третиране с триазини при NR тестовете (Фигура 13, A, B, E, F). Тези резултати предполагат различен механизъм на токсичност при различните туморни клетъчни линии.

Сравнявайки инхибиторните ефекти, причинени от трите тестови съединения е видно, че TCIC е най-цитотоксичният триазин със стойности на IC<sub>50</sub> (72) в диапазона 80-330 µg/mL (80.01 µg/mL за HeLa, 151.95 µg/mL за A549 и 326.13 µg/mL за CaOV) (Таблица 1). Нивото на цитотоксичност на трите триазинови вещества следва посоката TCIC>CA>THIC. THIC не демонстрира подчертано инхибиране на клетъчния растеж и жизненост. Нито един от триазините не показва по-силен инхибиторен ефект от циклоспорин А.

Получените резултати не показаха зависимост на антитуморното действие на TCIC от експресията на клаудин-12. Възможно е, това да се дължи на специфични за всяка клетъчна линия механизми на цитотоксичност. От друга страна, CA предизвика по-силно инхибиране при двете туморни клетъчни линии, които не експресират клаудин-12.

В допълнение към NR и МТТ анализите, цитотоксичността на CA, THIC, и TCIC беше изследвана чрез *in vitro* тестове за клоногенна ефективност. Целта на тези експерименти беше да се определи дали третирането с триазини засяга пролиферативния потенциал на клетките, който съответства на тяхната клоногенна ефективност. Използвани бяха само туморни клетъчни линии, тъй като нормалните фибробласти проявяват много нисък клоногенен капацитет. Както е показано на Фигура 14, TCIC индуцира силно инхибиране на клоногенната ефективност на всички клетъчни линии, която е подобна на ефектът на циклоспорин А. CA и THIC демонстрират значително по-ниско инхибиране - 5 до 20% при най-високите тествани концентрации на триазин.

**Таблица 1.** IC<sub>50</sub> (µg/mL), изчислени по резултати от различни *in vitro* тестове.

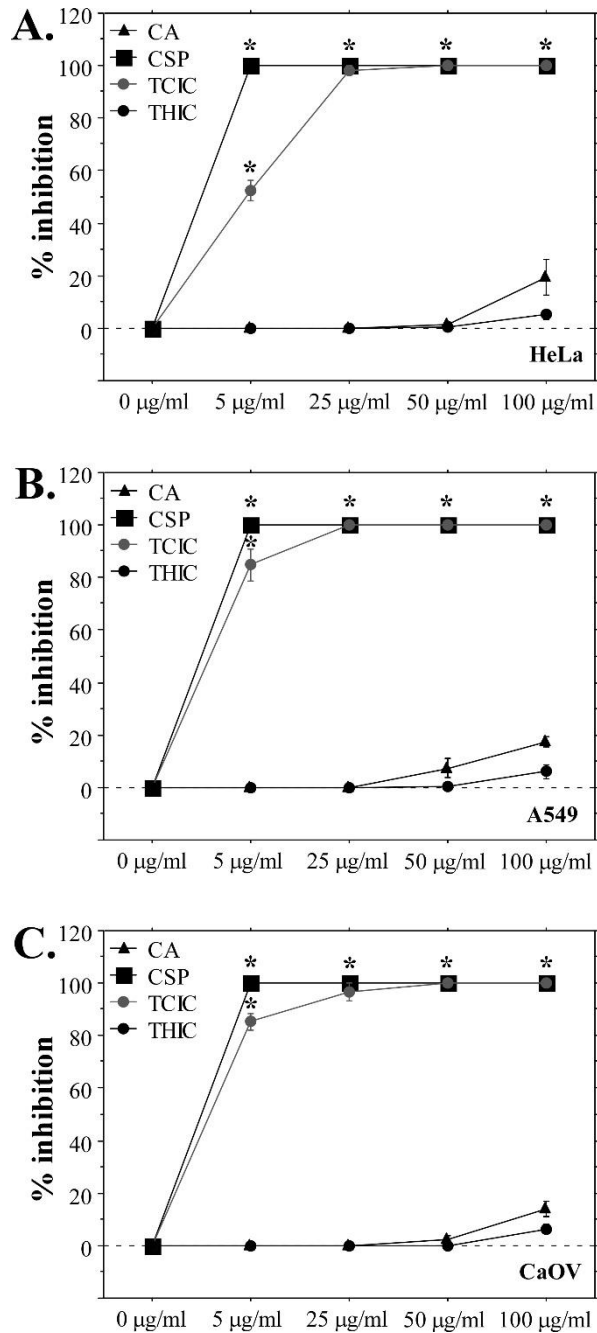
Клетъчни линии	Тест-вещества	IC <sub>50</sub> МТТ тест	IC <sub>50</sub> NR тест	IC <sub>50</sub> клоногенност
A549	CA	-	-	-
	TCIC	151.95 (±5.62)	-	7.95 (±1.24)
	THIC	-	-	-
	CSP	57.5 (±7.35)	45.57 (±1.43)	7.5
HeLa	CA	383.64 (±3.21)	447.37 (±3.25)	-
	TCIC	80.01 (±2.65)	-	9.57 (±1.14)
	THIC	-	-	-
	CSP	56.7 (±3.57)	51.31 (±5.87)	7.5
CaOV	CA	-	-	7.93 (±0.35)
	TCIC	326.13 (±7.35)	-	-
	THIC	-	-	-
	CSP	37.86 (±3.89)	64.53 (±10.59)	7.5
Фибробласти	CA	-	-	n.d.
	TCIC	-	-	n.d.
	THIC	-	-	n.d.
	CSP	54.7 (±6.35)	89.2 (±7.32)	n.d.

\* Стойностите за МТТ и NR тестовете са изчислени по данните от 72-часово третиране с триазини. n.d. – няма данни. (Таблицата е по публикацията *Batsalova et al., 2018, TFMO 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).*)

Изчислените IC<sub>50</sub> стойности въз основа на данните за клоногенността подчертават значителна разлика между TCIC (7-10 µg/mL IC<sub>50</sub>) и другите два тествани триазина (CA и THIC с IC<sub>50</sub> над 100 µg/mL) (Таблица 1). Тези данни допълват резултатите от МТТ и NR тестовете и демонстрират силна цитотоксичност на TCIC по отношение на репродуктивния потенциал на третираните с него клетки. Ефектът е съизмерим с този на известните цитостатични средства като циклоспорин.

TCIC предизвика най-високо ниво на цитотоксичност сред трите тествани триазини (CA, THIC, TCIC). Ето защо, за да проучим допълнително неговото въздействие върху клетъчната физиология, изследвахме нивата на АТФ в HeLa, A549 и F клетъчни линии. Клетъчните линии бяха подбрани по следните критерии: една крайна клетъчна линия, неекспресираща клаудин-12, осигуряваща контрола от нетуморни клетки, и два типа туморни клетъчни линии, от които една клаудин-12 експресираща (A549) и една – клаудин-12-отрицателна (HeLa). Клетките бяха изложени на 100 µg/mL TCIC в продължение на 24 часа.

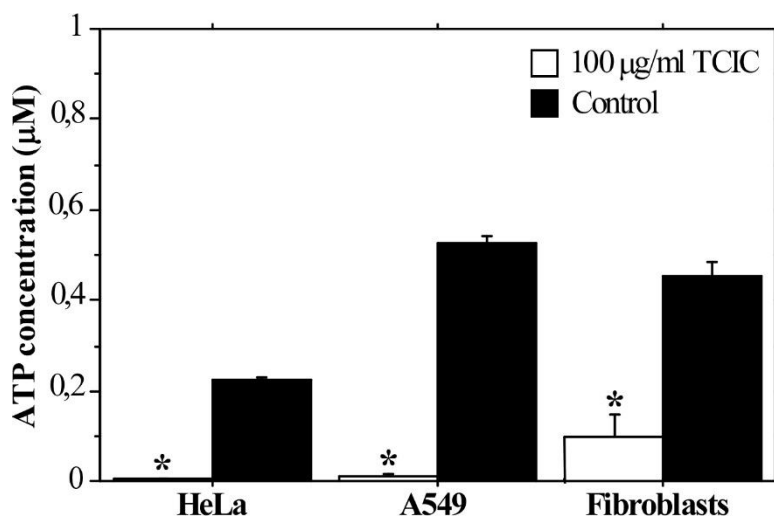
Тази концентрация бе избрана, поради значителната разлика в данните от MTT/NR тестовете и анализите на клоногенната ефективност.



**Фигура 14.** Инхибиране на клоногенността на туморни клетъчни линии, индуцирано от цианурова киселина и нейни деривати.

**A.** Резултати от тестове за клоногенна ефективност с HeLa клетки, третирани с триазини. **B.** Инхибиране на клоногенната ефективност на клаудин-12-експресиращи A549 клетки след третиране с триазини или циклоспорин; **C.** Инхибиране на клоногенността на CaOV клетки след култивиране в присъствие на CA, THIC, TCIC и CSP. Данните са представени като  $\pm$ SEM. \*  $p < 0.05$ . (Фигурата е от публикацията на Batsalova et al., 2018, *TFMO* 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).)

Докато  $IC_{50}$  стойностите, изчислени на база на МТТ и NR данните обикновено са по-високи от  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ , стойностите на  $IC_{50}$  при тестовете за клоногенност са повече от 10 пъти по-ниски. Вътреклетъчните нива на АТФ на третирани с ТСІС клетки бяха сравнени с резултатите за нетретирани HeLa, A549 клетки и фибробласти, култивирани в стандартна хранителна среда за същия тест-период (Фигура 15). Концентрацията на АТФ при всички типове клетки, третирани с ТСІС е значително намалена ( $p < 0.05$ ). Третираните с ТСІС фибробласти показаха малко по-високи нива на АТФ в сравнение с туморните клетъчни линии. Тази тенденция подкрепя резултатите от анализите чрез NR и МТТ тестове, които показват по-ниско ниво на инхибиране при нормални фибробласти.



**Фигура 15.** Вътреклетъчни концентрации на АТФ при контролни и третирани със  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  ТСІС клетки.

Контролните клетки и тези, третирани с ТСІС бяха култивирани за 24 часа. Графиката представя средни стойности от трипликати ( $\pm$ SE). \*  $p < 0.05$ . (Фигурата е от публикацията на Batsalova et al., 2018, *TFMO* 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).)

Третираните с триазини клетки бяха анализирани микроскопски, за да бъде оценено въздействието на СА, ТСІС и ТНІС върху клетъчната морфология. Снимки на A549 клетки и дермални фибробласти са представени на Фигура 16. В съответствие с резултатите от МТТ, NR и тестовете за клоногенна ефективност микроскопият анализ показва добре изразен ефект върху морфологията на клетки в култура след третирание с ТСІС. Клетъчните слоеве бяха нарушени; повечето клетки бяха свити и с нетипична морфология. Тези ефекти бяха силно изразени, когато клетките бяха третирани със  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  ТСІС. По-ниските концентрации на веществото не индуцираха силно изразен ефект. От друга страна, третирането с СА и ТНІС не повлия целостта на формираните клетъчни слоеве, както и клетъчната морфология.

Паралелно с проучванията върху цитотоксичността и антитуморната активност на СА, ТНС и ТСІС при клаудин-12-експресиращи клетки и клаудин-12-отрицателни клетъчни линии, беше установен антитуморен потенциал на друго вещество от групата на s-триазините - 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (СDMТ) (непубликувани данни). Третирането на А549, СаOV, HeLa и F клетки със СDMТ за 24 и 48 часа предизвика висок процент инхибиране дори при концентрации в диапазона 10-100 µg/mL. Установените IC<sub>50</sub> стойности за СDMТ бяха значително по-ниски от тези, изчислени при третиране с ТСІС на база данни от МТТ тест (Таблица 2), което е показател за значително по-високо ниво на токсичност на СDMТ в сравнение с ТСІС.

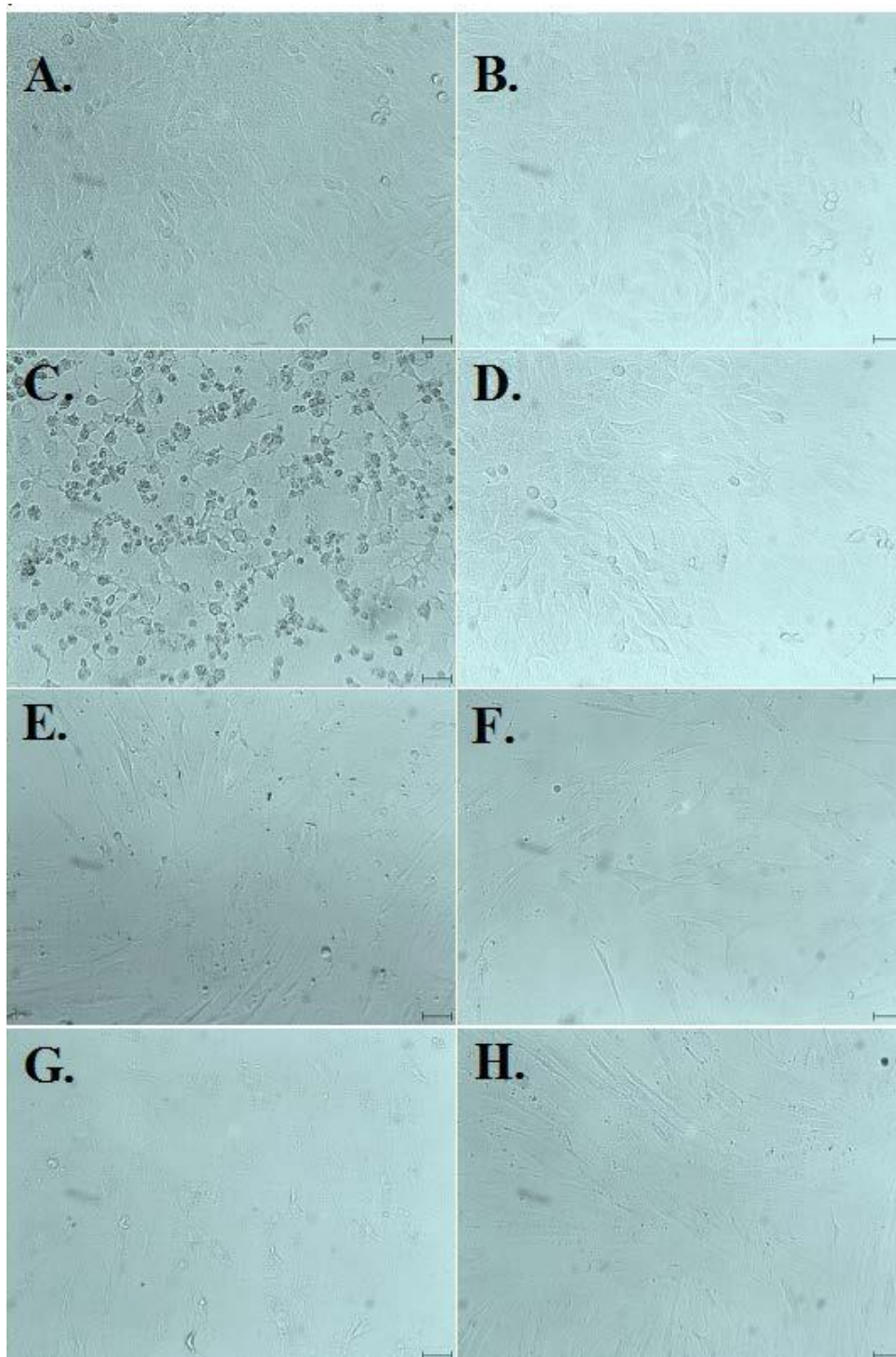
**Таблица 2.** Сравнение на IC<sub>50</sub> стойности (µg/mL) след 48-часово третиране с ТСІС или СDMТ.

Клетъчни линии	СDMТ	ТСІС
А549	127 ± 1,2 *	160 ± 7,5
СаOV	19 ± 5,3 ***	307,5 ± 5,3
HeLa	19,7 ± 3,7 ***	101 ± 0,7
F	67,9 ± 8,9	-

Представените данни са получени на база резултати от МТТ тест. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

Тази тенденция е налице дори при нетуморната клетъчна линия от дермални фибробласти. Докато за ТСІС не бе изчислена IC<sub>50</sub> стойност в тествания диапазон до 500 µg/mL, третирането със СDMТ индуцира 50% инхибиране на фибробластните култури при концентрация, по-ниска от 100 µg/mL. Въпреки това, туморните клетъчни линии HeLa и СаOV показаха по-висока чувствителност като бяха отчетени значително по-ниски IC<sub>50</sub>. Тези данни показват, че СDMТ притежава антитуморни свойства.

Освен по-силният цитотоксичен и антитуморен ефект на СDMТ, получените резултати показват и друга важна тенденция – клаудин-12-експресиращата клетъчна линия е съществено по-слабо повлияна от третирането със СDMТ в сравнение с останалите типове клетки. За да проучим този ефект, проведохме изследвания на вътреклетъчната концентрация на АТФ след третиране с две различни концентрации на СDMТ и ТСІС (20 и 100 µg/mL).



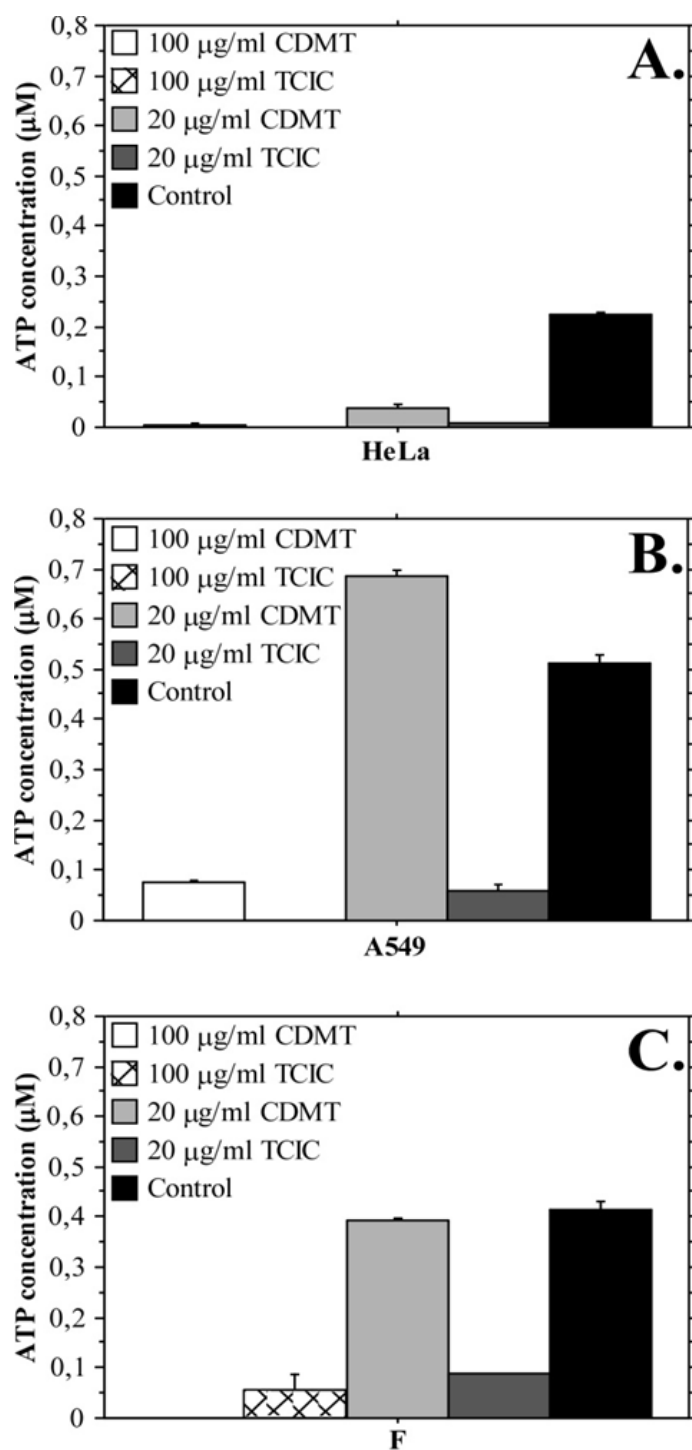
**Фигура 16.** Ефекти върху морфологията на А549 и F клетки след третиране с СА, ТНІС и ТСІС.

А549 клетки и фибробласти бяха третирани със 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  триазини за 24 часа, след което бяха анализирани микроскопски. Снимките бяха направени при наблюдение с 25x обектив, което определя 250x общо микроскопско увеличение. Черната отсечка на всяка снимка съответства на 10 $\mu\text{m}$ . **А., В., С.** - А549 клетки, третирани с СА, ТНІС и ТСІС; **Д.** А549 контрола; **Е., F., G.** – фибробласти, култивирани в присъствие на СА, ТНІС и ТСІС; **Н)** контролна култура от фибробласти. (Фигурата е от публикацията *Batsalova et al., 2018, TFMO 3(1):14-21 (Batsalova et al., 2018).*)

От тях стана ясно, че TCIC, приложен дори и в ниска концентрация, редуцира значително вътреклетъчните нива на АТФ и при трите клетъчни линии (Фигура 17). Третирането със 100 µg/mL CDMT имаше сходен ефект, но при прилагане на по-ниска концентрация съществена редукция на нивото на АТФ бе установено само при клаудин-12-отрицателните HeLa клетки, което кореспондира с данните от МТТ теста. Но при A549 беше наблюдаван противоположен ефект – значително повишение на концентрацията на АТФ в клетките при третиране с 20 µg/mL CDMT. Това предполага специфичен механизъм на действие на CDMT при тази клетъчна линия. Възможно е също така, токсичният ефект на триазина да зависи от концентрацията, в която се прилага.

Това предположение се подкрепя от факта, че CDMT предизвиква различен ефект върху клетъчната морфология при приложение в концентрация 20 µg/mL в сравнение с клетките, които бяха третирани със 100 µg/mL (Фигура 18). При ниска концентрация (5-20 µg/mL) на триазина се наблюдават голям брой окръглени клетки, което предполага изява на ефект, свързан с блокиране на митозата. От друга страна, третирането с високи концентрации CDMT (100 µg/mL) предизвика значително свиване на клетките, съществена промяна в клетъчната морфология и редукция на броя адхерентни клетки.

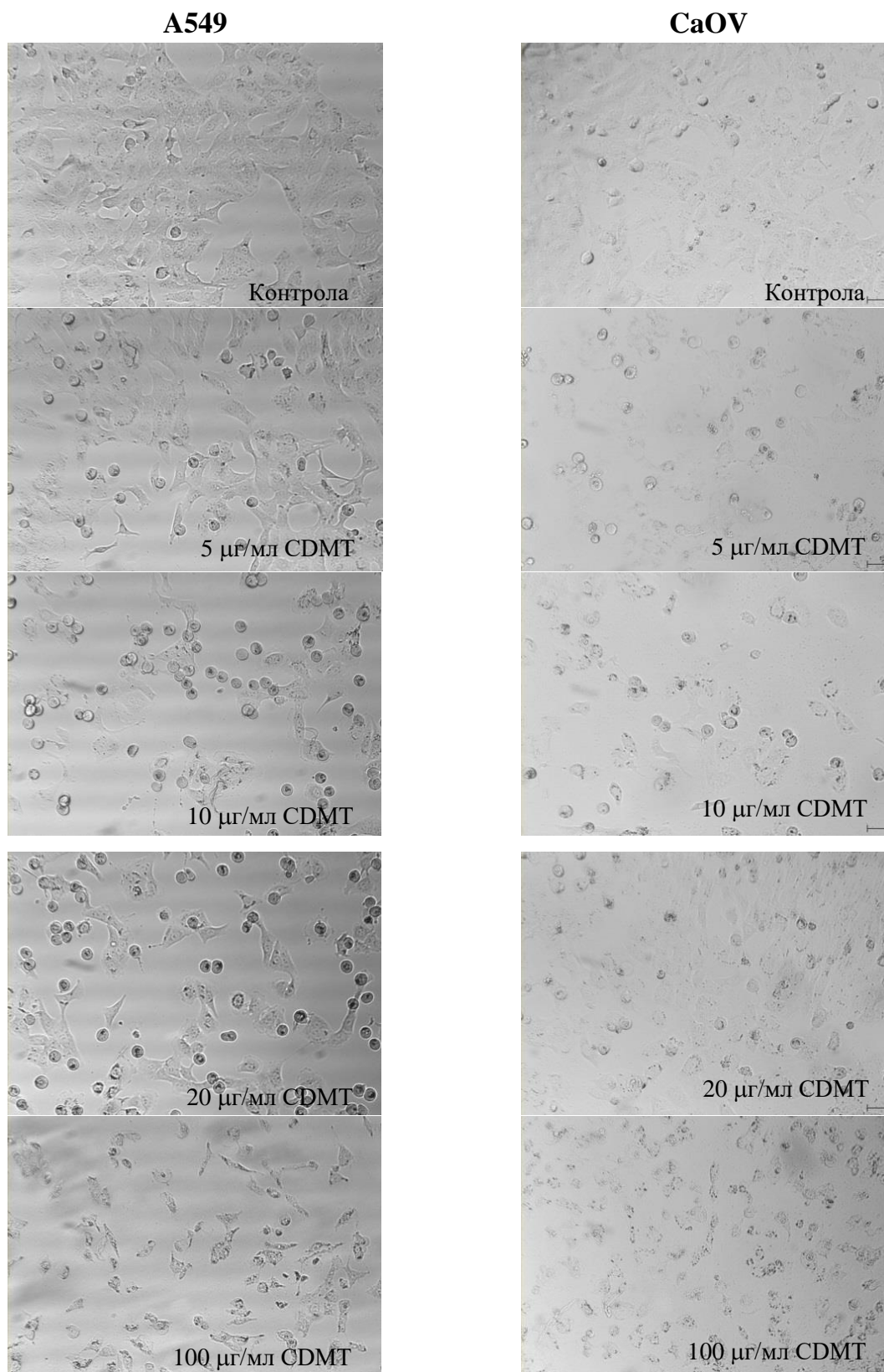
Тези ефекти се наблюдаваха както при клаудин-12-експресиращата линия, така и при CLDN12-отрицателната линия CaOV. Микроскопското наблюдение също отрази по-високата чувствителност на клаудин-12-неекспресиращите клетки спрямо CDMT – при концентрация 5 µg/mL при CaOV се наблюдаваха по-голям брой окръглени клетки, а още при концентрация 20 µg/mL беше налице друг тип ефект (доминантно нетипична клетъчна морфология, наблюдаваха се свити деформирани клетки, от които малка част бяха окръглени). Този преход в морфологичния ефект при A549 клетките бе налице след третиране с по-висока концентрация CDMT – 100 µg/mL.



**Фигура 17.** Вътреклетъчна концентрация на АТФ след 24-часово третиране с TCIC и CDMT.

**А.** Отчетено ниво на АТФ при HeLa клетки. **В.** Вътреклетъчна концентрация на АТФ при A549 клетки. **С.** Измерено ниво на АТФ при дермални фибробласти. Отчетените данни са представени като  $\pm$ SEM. Всички проби бяха залагани в трипликати.





**Фигура 18.** Влияние на различни концентрации CDMT и TCIC върху морфологията на A549 клетки.

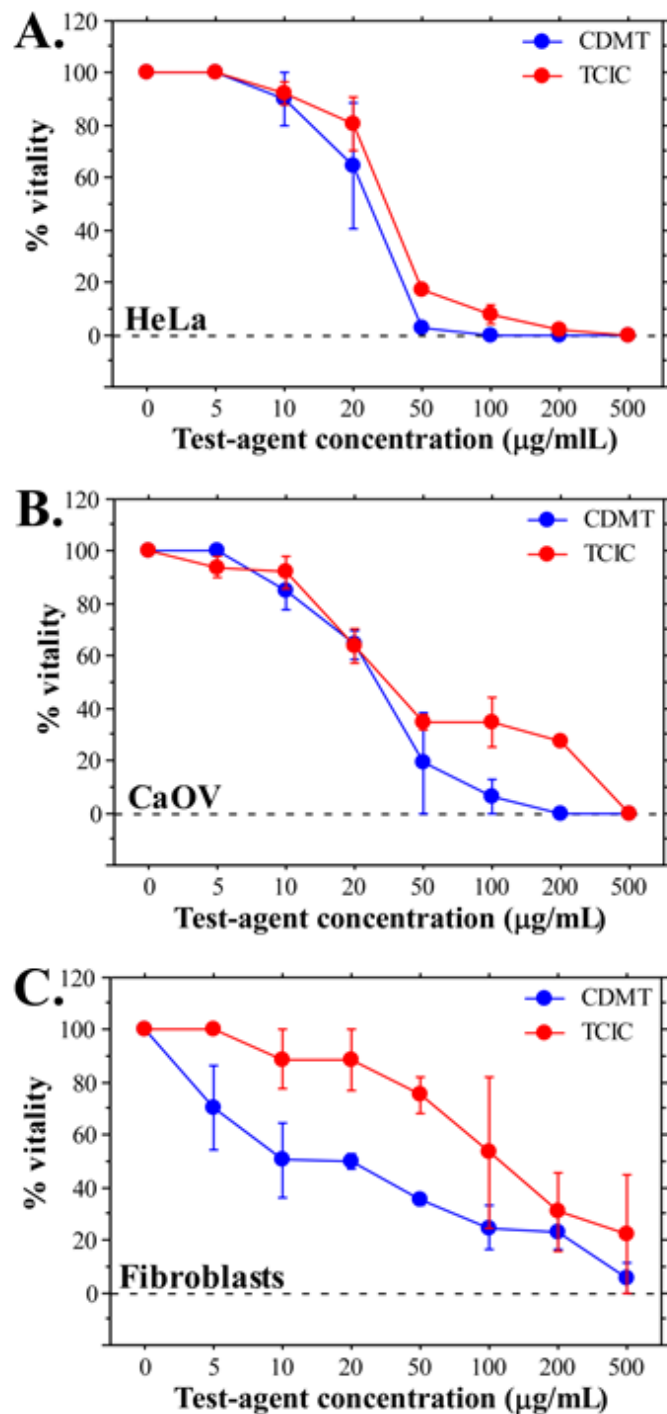
Клетките бяха култивирани в присъствие на посочените вещества за 24 часа. Снимките бяха направени при наблюдение с обектив 25х.

## 5.8. Специфичен ефект на CDMT при клаудин-12 експресиращата клетъчна линия A549

Отчетеният специфичен ефект на CDMT при A549 клетки, свързан с изменение на вътреклетъчното ниво на АТФ в зависимост от приложената концентрация, изява на характерни морфологични изменения и по-ниска степен на инхибиране на клетъчния метаболизъм в сравнение с клаудин-12-отрицателните клетъчни линии, даде основание да предположим влияние на експресията на клаудин-12 при изява на антитуморния ефект на този триазин. За да потвърдим тази хипотеза, бяха проведени *in vitro* тестове за клетъчна виталност със същите клетъчни линии – A549, HeLa, CaOV, F. Клетките бяха третирани за 24 часа с два от триазините, които проявиха антитуморен ефект – TCIC и CDMT. Целта на тези експерименти беше да дефинираме процента оцелели клетки след култивирането им в присъствие на различни концентрации от тест-веществата. Беше избран по-широк спектър от тест-концентрации на триазините, за да характеризираме по-детайлно ефектите им върху клетъчната виталност, базирайки се на резултатите от предходните изследвания.

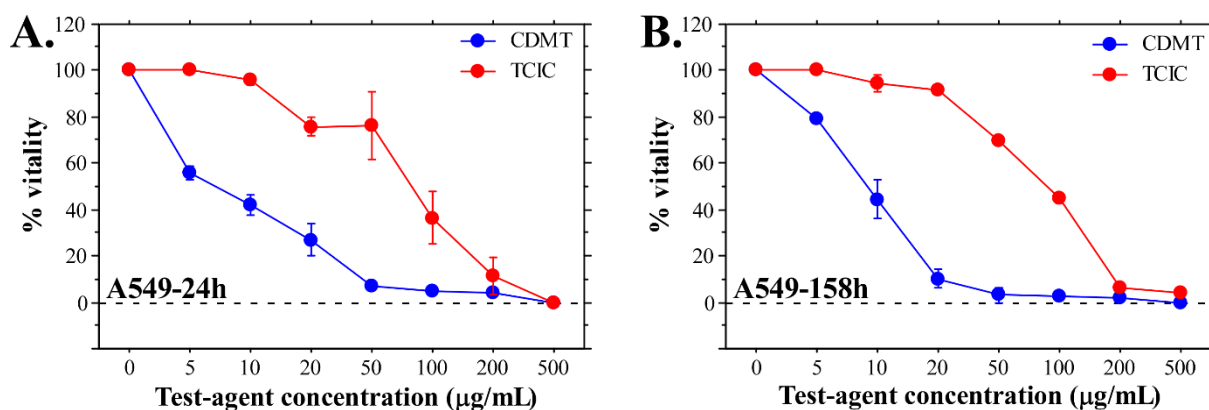
Резултатите от проведените *in vitro* тестове за виталност с A549, HeLa, CaOV клетки и фибробласти, третирани с различни концентрации CDMT и TCIC, са представени на Фигура 19 и Фигура 20.

От тях става ясно, че CDMT редуцира значително броя на живите клетки дори и в ниски концентрации (в диапазона 20-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Най-ниска преживяемост бе отчетена при раковите клетъчни линии след третиране със CDMT, което потвърждава антитуморното действие на веществото. Заедно с това бе отчетен интересен ефект при A549 клетъчната линия - третирането със CDMT оказва силен ефект върху преживяемостта на клетките дори при ниски концентрации на триазина в диапазона 5-20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Следователно, на ниво виталност A549 клетките демонстрират най-висока чувствителност към експозиция със CDMT. За да определим дали този токсичен ефект е дълготраен или клетките се адаптират и го преодоляват, проведохме тест за виталност с A549 клетки, които бяха култивирани за 158 часа в хранителна среда, съдържаща CDMT. Резултатите от него показват, че нивото на токсичност се запазва (Фигура 20). Ефектът върху преживяемостта на клетките бе сходен при третиране за 24 и 158 часа, както със CDMT, така и с TCIC. Това свидетелства, че токсичният ефект и на двата триазина е дълготраен.



**Фигура 19.** Ефекти върху преживяемостта на различни типове клетки в *in vitro* култура, отчетени след третиране с TCIC и CDMT.

**A.** Процент живи HeLa клетки, отчетен след инкубиране в присъствие на различни концентрации TCIC и CDMT; **B.** Преживяемост на дермални фибробласти след третиране с триазини; **C.** Виталност на третирани с TCIC и CDMT CaOV клетки; **D.** Преживяемост на бели кръвни клетки (WBC) след третиране с триазини. Всички клетки са култивирани за 24 часа в хранителна среда, съдържаща триазини в различна концентрация. Данните са представени като  $\pm$ SEM.



**Фигура 20.** *In vitro* тестове за виталност с A549 клетки, третирани с различни концентрации TCIC и CDMT за 24 и 158 часа.

**A.** Процент живи клетки след 24-часово третиране с триазини. **B.** Виталност на A549 клетки след 158 часа култивиране в присъствие на различни концентрации TCIC и CDMT. Данните са представени като  $\pm$ SEM.

## 6. Обсъждане

Клаудините са малки протеини (20–34 kDa) с четири трансмембранны домейна, които участват в структурата на плътните контакти (Krause et al., 2008; Lal-Nag and Morin, 2009). Те играят ключова роля за регулиране на междуклетъчната пропускливост за йони и малки молекули в различни типове епителна тъкан и за поддържане на клетъчната полярност (Kwon, 2013; Niessen, 2007). Заедно с това, клаудините са свързани с различни сигнални пътища, регулиращи клетъчната пролиферация и диференциация (Matter et al., 2005; Matter and Balda, 2003).

Нарушена регулация на експресията на клаудини се съобщава при различни видове рак, което предполага, че тези протеини могат да имат важна роля в миграцията, инвазията и метастазирането на раковите клетки (Kwon, 2013; Morin, 2005; Osanai et al., 2017; Singh et al., 2010; Sun et al., 2019; Tian et al., 2019). Доказано е, че по време на метастазиране, експресията на някои клаудини може да се увеличи или намали по специфичен за тъканите начин (Agarwal et al., 2005; Che et al., 2015; Lee et al., 2005; Miyamoto et al., 2008; Morohashi et al., 2007; Rangel et al., 2003; Sun et al., 2018, 2019; Usami et al., 2006; Yamada et al., 2016).

Повече от 90% от смъртните случаи при ракови заболявания се дължат на метастази (Fares et al., 2020). Метастатичният процес включва трансендотелна миграция на раковите клетки. Те трябва да напуснат първоначалното си място чрез навлизане в лумена на кръвоносните съдове, след което циркулират с кръвта и навлизат във вторично място, т.е. други области на тялото (Fares et al., 2020; Massague and Obenauf, 2016).

Метастазирането е придружено от нарушаване на плътните контакти, загуба на епителна/ендотелна цялост и повишен парацелуларен транспорт, осигурявайки пространство за подвижност на раковите клетки (Ouban and Ahmed, 2010). Ролята на клаудините за миграция на раковите клетки през плътните контакти все още не е изяснена. Експресията и функциите на тези протеини се регулират от различни механизми, включително дезинтеграция на контактите клетка-клетка, цитокини, хормони или други сигнални пътища. В нашето проучване ние се фокусирахме върху клаудин-12 (протеин без PDZ свързващ домейн) и неговото значение за клетъчната миграция по време на метастазиране.

Открихме, че получените от епител ракови клетъчни линии от дебело черво (LS180, Caco-2, HT-29) и от бял дроб (A549) експресират клаудин-12, докато ендотелните чернодробни SK-Hep-1, тестикуларни CaOV, цервикалните епителни HeLa ракови клетки и дермални фибробласти бяха клаудин-12 отрицателни. Тези данни са в съответствие с резултатите от други изследвания, които показват експресия на клаудин-12 в епитела и ендотела на стомашно-чревния тракт (Krause et al., 2008) или бронхиалните епителни клетки (Sun et al., 2019). Липсата на експресия на клаудинови протеини в HeLa клетки (клаудин-нулева клетъчна линия) също е докладвана по-рано (Cunniffe et al., 2014; Daugherty et al., 2007). Този сравнителен анализ показва, че клетъчните линии (A549, LS180, HeLa), използвани като модели в нашето проучване, са правилно подбрани.

Предварителната обработка на клетки, експресиращи клаудин-12 (A549, LS180), с анти-CLDN12 антители значително намали миграцията и пролиферацията им, като индуцира апоптоза. Нещо повече, подобна предварителна обработка блокира миграцията на Jurkat клетки през плътните контакти на формирани епителни клетъчни слоеве по време на ко-култивиране. Тези наблюдения са нови и демонстрират потенциалните способности на антителата срещу клаудин-12 да инхибират метастатичния процес в тъканите, експресиращи клаудин-12. Например, наскоро беше съобщено, че клаудин-12 участва в епитело-мезенхимния преход и миграцията на човешки бронхиални епителни BEAS 2B клетки (Sun et al., 2019). В допълнение, Sun и колектив са открили регулирана експресия на клаудин-12 в белодробни плоскоклетъчни карциномни (SqCC) тъкани, което определя гена за CLDN12 като протоонкоген в SqCC (Sun et al., 2019). По сходен начин Tian и колектив демонстрират, че свръхекспресията на клаудин-12 в цитоплазмата насърчава способността за пролиферация и миграция на остеосаркомните клетки (Tian et al., 2019). Вземайки предвид тъканно-специфичната експресия на клаудиновите протеини, Jiang и кол. отбелязват, че те могат да се използват като прогностични и диагностични биомаркери, напр. клаудин-1 за рак на дебелото черво, клаудин-3 за рак на яйчниците, клаудин-10 за

хепатоцелуларни карциноми и др. (Jiang et al., 2015). Аналогично, клаудин-12 може да се използва като биомаркер за прогресия на тумора и метастази в стомашно-чревния тракт, белодробния SqCC и остеосаркомите.

От друга страна, клаудиновите протеини бяха идентифицирани като потенциална мишена за антитуморна терапия (Jiang et al., 2015). Следователно блокирането на експресията на клаудин-12 или приложението на анти-клаудин-12 антитела трябва да има благоприятен ефект, инхибирайки туморната прогресия и метастази в тъкани, експресиращи клаудин-12. Нашите резултати показаха, че къси пептиди от първия извънклетъчен домейн на протеина клаудин-12 също са в състояние да намалят миграцията на клетките Jurkat през плътните контакти, което предполага, че конкурентните механизми на инхибиране чрез пептиди могат да бъдат полезни при терапевтичния подход, приложен към раковите метастази. Нашите резултати определят съществена роля на клаудин-12 за миграцията на ракови клетки през CLDN12-експресиращи тъкани в процеса на метастазиране.

Въз основа на получените данни може да бъде заключено, че CLDN12-пептидите предоставят потенциал за бъдещи проучвания с цел разработване на нови терапевтични подходи, насочени към клаудин-12-експресиращи туморни клетки или инхибиране на метастазирането. До момента, има съобщения за CLDN-пептиди, взаимодействащи с втория екстрацелуларен домейн (ECL2) на определени клаудини. Напр., пептидът DFYNP, който наподобява структурата на ECL2 от CLDN3 и CLDN4, намалява експресията на тези протеини и активира апоптотична клетъчна смърт при туморни клетки, изолирани от млечна жлеза (Baumgartner et al., 2011). Други изследвания показаха, че пептидите VPDSM и DSMKF, чиито структури не наподобяват ECL2 на CLDN3 и CLDN4, взаимодействат с клаудин-2 и предизвикват намаляване на нивата на протеина, както и увеличават чувствителността на белодробни карциномни клетки спрямо химиотерапевтици (Nasako et al., 2020). Тези изследвания и резултатите от нашите експерименти дават основание за бъдещи проучвания върху ефекта от третиране с CLDN12 пептиди и потенциала им да повишат ефективността на класическите химиотерапевтични агенти. От особен интерес са проучванията върху пептиди съответстващи на първия екстрацелуларен домен от клаудиновата молекула, за които все още няма данни по отношение потенциала им за антитуморна терапия.

Установихме, че мигриращите Jurkat клетки експресират както интегрин LFA-1, така и L-селектин (CD62L). Добре известно е, че LFA-1 и L-селектинът играят основна роля за адхезията на циркулиращите левкоцити към ендотелните клетки, регулиращи активирането и миграцията на Т-клетките през ендотела (Grailer et al., 2009; Sigal et al., 2000; Walling and Kim, 2018). Въз основа на нашето наблюдение, че

антителата срещу клаудин-12 намаляват броя на мигриралите клетки Jurkat, ние предположихме, че клаудин-12 е лиганд за LFA-1 и/или L-селектин. Необходими са обаче допълнителни проучвания, за да се докаже дали клаудин-12 се свързва с LFA-1 и L-селектин, което води до нарушаване на плътните контакти и миграция на Т-клетките.

След като доказахме ролята на клаудин-12 за клетъчната миграция и виталност, подчертавайки значението му като потенциална цел за антитуморна терапия, изследванията върху функционалността на протеина продължиха в друга насока, която допълва спецификата на разглежданата тематика. Проучвайки клаудин-12 като потенциален кандидат за нов тип терапия за ракови заболявания, възникна въпроса дали този протеин има отношение към клетъчната реакция спрямо вещества с антитуморно действие.

Във връзка с това проведохме проучвания върху цитотоксичното и антитуморно действие на четири вещества, използвайки клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-неекспресиращи клетки. Подбраните за това проучване химични съединения са представители на групата на 1,3,5-триазините (s-триазини) – една от най-старите известни групи органични съединения с уникални химични свойства (Bartholomew, 1996). S-триазиновата структура е считана за забележителен инструмент в органичния синтез, тъй като може да встъпва в различни видове взаимодействия (напр. формиране на водородни връзки, обмен на заряд и електростатични привличания, взаимодействия, свързани с формиране на комплексни структури от няколко ароматни пръстена и др.) (Hoz and Sánchez-Migallón, 2017). Симетричната структура на 1,3,5-триазините и техния висок афинитет за свързване с много клетъчни ензими ги прави подходящ кандидат за синтез на съединения с терапевтична активност и различни приложения. Поради техните уникални фармакологични свойства, много s-триазинови производни са широко използвани като химиотерапевтици, хербициди, пестициди, антибактериални агенти, инхибитори на корозията, ензимни инхибитори и др. (Bartholomew, 1996).

Циануровата киселина (CA), трихлороизоцианурова киселина (TCIC), 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) и 1,3,5-трис(2-хидроксиетил) изоцианурат (THIC) принадлежат към тази група триазини с широко приложение. Нашите изследвания показаха, че CDMT и TCIC имат високо ниво на цитотоксичност с  $IC_{50}$  в диапазон съответно 16-127  $\mu\text{g}/\text{mL}$  и 80-151.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , но CA и THIC проявяват значително по-нисък токсичен потенциал. THIC се оказа най-малко токсичното съединение сред четирите тествани триазини. Нашите данни потвърждават предишни доклади, показващи ниска цитотоксичност на CA и THIC спрямо различни животински клетъчни линии (Dobson et al., 2008; Hammond et al., 1986; Liu et al., 2014; Loveday et al., 1990).

Санчес-Фортун и колектив са изследвали цито- и генотоксичността на ТСІС в сравнение с две други вещества с дезинфекциращи свойства. Те съобщават, че при концентрация 1.2 mg/L ТСІС предизвиква нарушаване структурата на ДНК в рибни клетки от клетъчната линия RTG-2.12 (Sanchez-Fortun et al., 2008). Техните резултати показват по-висока чувствителност на рибните клетки спрямо ТСІС, когато се сравняват с други типове клетки. Например, тестове на Ames със *Salmonella* клетки показаха, че ТСІС не предизвиква генни мутации (Zeiger et al., 1987). В сравнение с настоящото проучване, RTG-2 клетките отново проявяват по-висока чувствителност спрямо ТСІС, тъй като отчетената за тях стойност на IC<sub>50</sub> (48 часа) е 30.73 µg/mL, определена чрез NR тест (Sanchez-Fortun et al., 2008). При нашите изследвания, дефинирахме IC<sub>50</sub> (72 часа) на ТСІС спрямо човешки клетъчни линии въз основа на резултатите от МТТ анализ, докато при NR анализите тези стойности бяха по-високи от 500 µg/mL.

Цитотоксичността на циануровата киселина и смеси на СА и меламина е изследвана спрямо помощта на човешки ембрионални бъбречни клетки (НЕК-293) (Liu et al., 2014), кучешки бъбречни клетки (MDCK) (Dobson et al., 2008), плъши NRK-52E клетки и човешки клетки HEK293T (Sun et al., 2016). В съответствие с нашите резултати докладваните данни показват ниско ниво на токсичност на СА с IC<sub>50</sub> стойности, по-високи от 1 mg/mL (Sun et al., 2016).

*In vitro* изследвания върху токсичността на ТНІС спрямо човешки клетки не са докладвани. Проучвания със *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA1535 и TA1537 не показаха цитотоксични ефекти на ТНІС в концентрация 100-10000 µg/плака с и без активиране (Zeiger et al., 1992). Анализи за обмен на сестрински хроматиди при яйчникови клетки на китайски хамстер при ТНІС концентрации от 0.402, 1.210, 4.020 µg/mL без активиране и 0.381, 1.140, 2.290, 3.810 µg/mL с активиране не показаха генотоксичен ефект (Loveday et al., 1990). Нашите данни демонстрираха много слаба цитотоксичност на ТНІС срещу човешки ракови клетъчни линии и липса на дългосрочна токсичност спрямо нормални дермални фибробласти. Следователно, те подкрепят предишни констатации относно ефекта на ТНІС спрямо други видове клетки.

Данни за антитуморната активност на 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (CDMT) не се откриват, като това мотивира и определя нашето изследване като пионерно в тази насока. Съединението се използва за синтез на нови 4,6-диметокси-N-фенил-1,3,5-триазин-2-аминови производни с фунгицидна и бактерицидна активност, както става ясно от проведени експерименти от Shinde и колектив (Shinde and Salunke, 2015).

S-триазиновият пръстен осигурява подходяща база за синтез на биологично активни съединения с по-ниска токсичност и по-висока



ефективност от други нетриазинови хетероциклични съединения (Singla et al., 2015). Въпреки, че към днешна дата малко съединения са достигнали до ниво на клинични изпитвания, перспективата за намиране на безвредни агенти с терапевтичен потенциал, особено за лечение на туморни заболявания, стимулира усилията на учените за търсене на подходящо съединение от групата на s-триазиновите деривати. Досега изследванията в тази област бяха фокусирани върху молекули с високо молекулно тегло и сложна структура. Няма информация за потенциалните противоракови свойства на прости s-триазинови производни, много от които са важни индустриални субстанции с различни приложения, включително синтез на антинеопластични средства. Затова, нашите *in vitro* анализи на цитотоксичността включваха както туморни, така и нормални клетъчни линии, позволяващи оценка на потенциалния противотуморен ефект на изследваните триазини. Заедно с това, имахме възможност да сравним ефектите на тези вещества при клаудин-12-експресиращи и клаудин-12-нулеви клетки. Нашите данни показват селективен противораков ефект на TCIC, като най-висока чувствителност прояви клаудин-12-отрицателната клетъчна линия HeLa. Този триазин инхибира митохондриалната активност в раковите клетки. Нормалните фибробласти не бяха повлияни значително от третирането с TCIC. Клоногенната ефективност на раковите клетки също бе сериозно засегната.

Подробни анализи на взаимовръзката структура-активност (SAR) на SA, THIC, TCIC или CDMT не са докладвани. Ясно е обаче, че цитотоксичността на тези съединения е силно зависима от тяхната структура и химични свойства. Симетричното разпределение на азотните атоми в s-триазиновия пръстен улеснява свързването на различни функционални групи на втора, четвърта и шеста позиция (Bartholomew, 1996). Свойствата на всеки заместител и характерните особености на пръстенната структура са отговорни за реактивността на различните s-триазини. SA може да свърже до три хлорни атома и по този начин да образува TCIC. Предполага се, че TCIC може да служи като източник на хлорни йони *in situ*, които действат като катализатор за различни реакции (органични трансформации) (Tilstam and Weinmann, 2002). Вероятно подобна реактивност може да проявява и CDMT като наличието на метокси групи при този триазин допринася за изява на специфична биологична функционалност. *In vitro* тези реакции могат да повлияят и да модифицират много клетъчни молекули, нарушавайки нормалната клетъчна физиология и морфология. Следователно, значимите цитотоксични ефекти на TCIC може да бъдат отдадени на химическата му структура и свойства, но са необходими допълнителни експерименти за изясняване на механизмите на токсичност.

Настоящото изследване доказва необходимостта от прилагането на няколко различни типа *in vitro* тестове за цитотоксичност и антитуморна активност с цел да се характеризират по-добре инхибиторните ефекти, предизвикани от култивиране на клетките в присъствие на тест-агент. Съобщаваме за първи път силна цитотоксичност на TCIC и CDMT в съчетание с изразен антитуморен ефект. Данните от MTT и NR тестовете показваха, че TCIC засяга предимно митохондриалната функционалност, което е свързано и с производството на АТФ. За да потвърдим този ефект, бяха направени измервания на вътреклетъчната концентрация на АТФ след третиране с TCIC и CDMT. Тествани бяха две концентрации на тест-агентите – 100 и 20 µg/mL, съответно: по-висока концентрация, при която се наблюдава значителна редукция във виталността на клетките, и по-ниска концентрация, при която голяма част от третираните клетки запазват жизнеността си.

Нивото на АТФ е важен детерминант на митохондриалната активност и жизнеността на клетката (Richter et al., 1996). Ако то падне под определен критичен праг, настъпва апоптоза (Green and Reed, 1998). По отношение на нашето изследване от интерес бе въпроса дали нормалното вътреклетъчно ниво на АТФ се променя при ракови клетъчни линии и нормални клетки (дермални фибробласти) след третиране с различни концентрации CDMT и TCIC. Получените резултати доказаха, че TCIC засяга основно клетъчните митохондрии. Наред с това, беше отчетена необичайна реакция при клаудин-12-експресиращите A549 клетки след третиране със CDMT, която потвърди резултатите от проведените MTT тестове. Най-висока IC<sub>50</sub> стойност след култивиране в присъствие на CDMT бе отчетена при A549 клетките, а третиране с ниска концентрация на триазина (20 µg/mL) предизвика съществено повишаване на вътреклетъчното ниво на АТФ, което не бе налице при HeLa клетките и дермалните фибробласти. Това предполага специфичен механизъм на действие при клаудин-12-експресиращи клетки. Заедно с това, A549 клетките показаха най-висока чувствителност към CDMT на ниво клетъчна виталност, което може да се дължи на взаимодействие между клаудин-12 и CDMT. Това предположение се обосновава от доказаната роля на клаудин-12 за клетъчната пролиферация и виталност (Kolchakova et al., 2021; Tian et al., 2019) Необходимо е провеждането на допълнителни изследвания, които да потвърдят и дефинират специфичния механизъм на CDMT токсичност спрямо клаудин-12-експресиращи A549 клетки.

До момента не са докладвани взаимодействия между триазини и клаудини, които имат отношение към туморните заболявания, туморогенезата или процеса на метастазиране. Налице са данни за други патологични процеси. Например, установено е, че ирзогладин малеат (2,4-Diamino-6-(2,5-dichlorophenyl)-s-triazine maleate) активира експресията на

клаудин-3, възстановявайки структурата на стомашната лигавица при портална гастропатия (Yokoama et al., 2021). Други изследвания показват, че третиране със същото вещество увеличава експресията на клаудини 1 и 4, спомагайки по този начин за поддържане структурата на назалната епителна бариера (Miyata et al., 2015). Не са докладвани взаимовръзки между третиране с триазини и експресията на клаудинови протеини при различни типове туморни клетки. Имайки предвид обаче високата биологична активност на редица триазини, както и широкият диапазон от взаимодействия, в които могат да встъпват клаудините, наличието на подобна зависимост не може да бъде изключена. Добре известно е, че различните типове клаудини повлияват поведението на туморните клетки по различни механизми, оказвайки стимулиращо или негативно въздействие (D'Souza et al., 2005; Li et al., 2013; Sun et al., 2019). Възможна причина за това могат да бъдат функционалностите на различните клаудини, които са специфични и зависят от взаимодействащите с тях молекули в различните типове клетки (Micke et al., 2014; Sun et al., 2018, 2019). Липсата на PZD домейн при клаудин-12, който определя възможността за свързване с цитоскелета чрез ZO-1, ZO-2 и ZO-3 (Itoh et al., 1999), както и съобщената цитоплазмена и ядрена експресия на протеина (Fujita et al., 2006; Tian et al., 2019), предполага потенциал за участие в редица вътреклетъчни сигнални пътища и взаимодействие с различни регулаторни молекули, както и терапевтични агенти. В този ред на мисли, налице е вероятност вътреклетъчни клаудини да взаимодействат и модулират ефекта на химиотерапевтични агенти. Известно е, че триазините навлизат лесно в клетките и са чудесна платформа за доставяне на лекарства поради тяхната многовалентност (Lim et al., 2019) и следователно биха могли да реагират с редица клетъчни молекули, включително клаудини. Възможно е именно взаимодействие между CDMT и клаудин-12 да определя специфичният модел на токсичност, който установихме при A549 клетки. Необходими са обаче допълнителни изследвания, за да бъде потвърдена тази хипотеза. Налице е критична необходимост от повече информация за клаудин-асоциираните сигнални пътища, за да бъде изяснена многостранната роля на тези протеини при туморните заболявания. Клаудин-12 взема участие в различни сигнални пътища в зависимост от клетъчната си локализация, проявява различни активности, които регулират туморното развитие, метастазирание, както и ефективността на терапевтични агенти.

Изследванията, включени в настоящата дисертация, доказват ролята на клаудин-12 за клетъчната пролиферация, виталност и миграция, включително миграция по време на метастазирание. Представените резултати определят клаудин-12 като подходящ биомаркер за туморно развитие и метастаза и перспективна цел за разработване на антитуморна терапия.

## 7. ИЗВОДИ

На база на получените при настоящото изследване резултати бяха формулирани следните изводи:

1. Клаудин-12 се експресира при туморни клетъчни линии с епителен произход, изолирани от бял дроб (A549) и дебело черво (Caco-2, LS180, HT-29).
2. Виталността и пролиферацията на туморни клетки се контролира от механизми, в които участва клаудин-12.
3. Клаудин-12 има роля в процесите на миграция на клетките, които го експресират.
4. Клаудин-12 участва в миграцията по време на метастазиране.
5. Метастатични левкемични клетки използват LFA-1 и/или CD61L, за да мигрират през плънните контакти между клетки, експресиращи клаудин-12.
6. Първият извънклетъчен домейн на клаудин-12 участва във взаимодействията, медиращи миграцията през плътните контакти.
7. Клаудин-12 участва в модулиране на антитуморното действие на някои нискомолекулни органични вещества от групата на s-триазините.
8. Трихлороизоциануровата киселина проявява селективен антитуморен ефект спрямо клаудин-12-отрицателни HeLa клетки.
9. Механизмът на токсичното действие на 2-хлоро-4,6-диметокси-1,3,5-триазин спрямо клаудин-12-експресиращи A549 клетки е различен от този при CLDN12-отрицателни туморни клетки.

## 8. Литература, цитирана в автореферата

- Agarwal, R., D'Souza, T., and Morin, P.J. (2005). Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. *Cancer research* 65, 7378-7385.
- Bartholomew, D. (1996). 1,3,5-Triazines. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, A.J. Boulton, ed. (Oxford, New York: Pergamon Press).
- Batsalova, T., Kolchakova, D., and Dzhambazov, B. (2018). In Vitro Cytotoxicity of Cyanuric Acid and Selected Derivatives. *Toxicology Forensic Medicine Open Journal* 3, 14-21.
- Baumgartner, H.K., Beeman, N., Hodges, R.S., and Neville, M.C. (2011). A D-peptide analog of the second extracellular loop of claudin-3 and -4 leads to mislocalized claudin and cellular apoptosis in mammary epithelial cells. *Chemical biology & drug design* 77, 124-136.
- Che, J., Yang, Y., Xiao, J., Zhao, P., Yan, B., Dong, S., and Cao, B. (2015). Decreased expression of claudin-3 is associated with a poor prognosis and EMT in completely resected squamous cell lung carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 6559-6568.

- Cunniffe, C., Brankin, B., Lambkin, H., and Ryan, F. (2014). The role of claudin-1 and claudin-7 in cervical tumorigenesis. *Anticancer research* 34, 2851-2857.
- D'Souza, T., Agarwal, R., and Morin, P.J. (2005). Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 26233-26240.
- Daugherty, B.L., Ward, C., Smith, T., Ritzenthaler, J.D., and Koval, M. (2007). Regulation of heterotypic claudin compatibility. *The Journal of biological chemistry* 282, 30005-30013.
- Dobson, R.L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T., Baker, T.R., Pullen, A.M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A.S., Vennard, T., Fix, A., *et al.* (2008). Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106, 251-262.
- Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., and Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal transduction and targeted therapy* 5, 28.
- Fujita, H., Chiba, H., Yokozaki, H., Sakai, N., Sugimoto, K., Wada, T., Kojima, T., Yamashita, T., and Sawada, N. (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 54, 933-944.
- Grailer, J.J., Kodera, M., and Steeber, D.A. (2009). L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *Journal of dermatological science* 56, 141-147.
- Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Hammond, B.G., Barbee, S.J., Inoue, T., Ishida, N., Levinskas, G.J., Stevens, M.W., Wheeler, A.G., and Cascieri, T. (1986). A review of toxicology studies on cyanurate and its chlorinated derivatives. *Environmental health perspectives* 69, 287-292.
- Hoz, A., and Sánchez-Migallón, A. (2017). Green synthesis of 1,3,5-triazines with applications in supramolecular and materials chemistry. *Targets in Heterocyclic Systems*, 139-173.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147, 1351-1363.
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S.K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., *et al.* (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in cancer biology* 35 Suppl, S244-S275.
- Kolchakova, D., Moten, D., Batsalova, T., and Dzhabazov, B. (2021). Tight Junction Protein Claudin-12 Is Involved in Cell Migration during Metastasis. *Biomolecules* 11.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., and Blasig, I.E. (2008). Structure and function of claudins. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 631-645.
- Kwon, M.J. (2013). Emerging roles of claudins in human cancer. *International journal of molecular sciences* 14, 18148-18180.
- Lal-Nag, M., and Morin, P.J. (2009). The claudins. *Genome biology* 10, 235.
- Lee, J.W., Lee, S.J., Seo, J., Song, S.Y., Ahn, G., Park, C.S., Lee, J.H., Kim, B.G., and Bae, D.S. (2005). Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. *Gynecologic oncology* 97, 53-59.
- Li, X., Li, Y., Qiu, H., and Wang, Y. (2013). Downregulation of claudin-7 potentiates cellular proliferation and invasion in endometrial cancer. *Oncology letters* 6, 101-105.

- Lim, J., Guan, B., Nham, K., Hao, G., Sun, X., and Simanek, E.E. (2019). Tumor Uptake of Triazine Dendrimers Decorated with Four, Sixteen, and Sixty-Four PSMA-Targeted Ligands: Passive versus Active Tumor Targeting. *Biomolecules* 9, 421.
- Liu, X., Huang da, W., Wu, K.J., Wu, Y.N., Jia, X.W., and Gong, Z.Y. (2014). An evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of melamine in combination with cyanuric acid at three mass ratios. *Biomedical and environmental sciences : BES* 27, 641-645.
- Loveday, K.S., Anderson, B.E., Resnick, M.A., and Zeiger, E. (1990). Chromosome aberration and sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. V: Results with 46 chemicals. *Environmental and molecular mutagenesis* 16, 272-303.
- Massague, J., and Obenauf, A.C. (2016). Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529, 298-306.
- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., and Balda, M.S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current opinion in cell biology* 17, 453-458.
- Matter, K., and Balda, M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 225-236.
- Micke, P., Mattsson, J.S., Edlund, K., Lohr, M., Jirstrom, K., Berglund, A., Botling, J., Rahnenfuehrer, J., Marincevic, M., Ponten, F., *et al.* (2014). Aberrantly activated claudin 6 and 18.2 as potential therapy targets in non-small-cell lung cancer. *International journal of cancer* 135, 2206-2214.
- Miyamoto, K., Kusumi, T., Sato, F., Kawasaki, H., Shibata, S., Ohashi, M., Hakamada, K., Sasaki, M., and Kijima, H. (2008). Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedical research* 29, 71-76.
- Miyata, R., Nomura, K., Kakuki, T., Takano, K., Kohno, T., Konno, T., Sawada, N., Himi, T., and Kojima, T. (2015). Irsogladine maleate regulates gap junctional intercellular communication-dependent epithelial barrier in human nasal epithelial cells. *The Journal of membrane biology* 248, 327-336.
- Morin, P.J. (2005). Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer research* 65, 9603-9606.
- Morohashi, S., Kusumi, T., Sato, F., Odagiri, H., Chiba, H., Yoshihara, S., Hakamada, K., Sasaki, M., and Kijima, H. (2007). Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *International journal of molecular medicine* 20, 139-143.
- Nasako, H., Akizuki, R., Takashina, Y., Ishikawa, Y., Shinoda, T., Shirouzu, M., Asai, T., Matsunaga, T., Endo, S., and Ikari, A. (2020). Claudin-2 binding peptides, VPDSM and DSMKF, down-regulate claudin-2 expression and anticancer resistance in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochimica et biophysica acta Molecular cell research* 1867, 118642.
- Niessen, C.M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology* 127, 2525-2532.
- Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M., and Sawada, N. (2017). Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 469, 55-67.
- Ouban, A., and Ahmed, A.A. (2010). Claudins in human cancer: a review. *Histology and histopathology* 25, 83-90.
- Rangel, L.B., Agarwal, R., D'Souza, T., Pizer, E.S., Alo, P.L., Lancaster, W.D., Gregoire, L., Schwartz, D.R., Cho, K.R., and Morin, P.J. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 2567-2575.

- Richter, C., Schweizer, M., Cossarizza, A., and Franceschi, C. (1996). Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS letters* 378, 107-110.
- Sanchez-Fortun, S., Llorente, M.T., and Castano, A. (2008). Cytotoxic and genotoxic effect in RTG-2 cell line exposed to selected biocides used in the disinfection of cooling towers. *Ecotoxicology* 17, 273-279.
- Shinde, S.R., and Salunke, D.S. (2015). Synthesis of novel substituted 4,6-dimethoxy-N-phenyl-1,3,5-triazine-2-amine derivatives and their antibacterial and antifungal activities. *Asian Journal of Chemistry* 27, 4130-4134.
- Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S.J., Dwir, O., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Alon, R. (2000). The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *Journal of immunology* 165, 442-452.
- Singh, A.B., Sharma, A., and Dhawan, P. (2010). Claudin family of proteins and cancer: an overview. *Journal of oncology* 2010, 541957.
- Singla, P., Luxami, V., and Paul, K. (2015). Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior. *European journal of medicinal chemistry* 102, 39-57.
- Sun, H., Wang, K., Wei, H., Li, Z., and Zhao, H. (2016). Cytotoxicity, organ distribution and morphological effects of melamine and cyanuric acid in rats. *Toxicology mechanisms and methods* 26, 501-510.
- Sun, L., Feng, L., and Cui, J. (2018). Increased expression of claudin-17 promotes a malignant phenotype in hepatocyte via Tyk2/Stat3 signaling and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagnostic pathology* 13, 72.
- Sun, L., Feng, L., and Cui, J. (2019). Increased expression of claudin-12 promotes the metastatic phenotype of human bronchial epithelial cells and is associated with poor prognosis in lung squamous cell carcinoma. *Experimental and therapeutic medicine* 17, 165-174.
- Tian, X., He, Y., Han, Z., Su, H., and Chu, C. (2019). The Cytoplasmic Expression Of CLDN12 Predicts An Unfavorable Prognosis And Promotes Proliferation And Migration Of Osteosarcoma. *Cancer management and research* 11, 9339-9351.
- Tilstam, U., and Weinmann, H. (2002). Trichloroisocyanuric acid: A safe and efficient oxidant. *Org Proc Res Dev* 6, 384-393.
- Usami, Y., Chiba, H., Nakayama, F., Ueda, J., Matsuda, Y., Sawada, N., Komori, T., Ito, A., and Yokozaki, H. (2006). Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Human pathology* 37, 569-577.
- Walling, B.L., and Kim, M. (2018). LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Frontiers in immunology* 9, 952.
- Yamada, G., Murata, M., Takasawa, A., Nojima, M., Mori, Y., Sawada, N., and Takahashi, H. (2016). Increased expressions of claudin 4 and 7 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Medical molecular morphology* 49, 163-169.
- Yokoyama, K., Irie, M., Tsuchiya, N., Yamauchi, E., Kawashima, M., Miyayama, T., Fukuda, H., Yamauchi, R., Umeda, K., Takata, K., *et al.* (2021). Irsogladine maleate alters expression of a tight junction protein in portal hypertensive gastropathy. *Journal of gastroenterology and hepatology* 36, 1208-1215.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., and Mortelmans, K. (1992). Salmonella mutagenicity tests: V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environmental and molecular mutagenesis* 19 Suppl 21, 2-141.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., and Speck, W. (1987). Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental mutagenesis* 9 Suppl 9, 1-109.

# **ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

## **Оригинални научни приноси:**

- За първи път се изследва ролята на протеина клаудин-12 за миграция на туморните клетки, които го експресират, като се демонстрира, че блокирането на този протеин води до значително редуциране на клетъчната миграция, съответно на туморните метастази.
- За първи път се изследва ролята на протеина клаудин-12 за миграция на туморни клетки през формирани клетъчни слоеве, съдържащи плътни междуклетъчни контакти, в които участва клаудин-12, като се показва, че липсата или блокирането на клаудин-12 предотвратява преминаването на туморни клетки през междуклетъчните контакти, което би имало инхибиращ ефект за процеса на метастазиране.
- За първи път се изследва ролята на протеина клаудин-12 за виталността на клетките, които го експресират, като се показва, че неговото блокиране води до индуциране на апоптоза и съответно инхибиране на клетъчната пролиферация.
- За първи път се изследва участието на клаудин-12 в модулиране на антитуморното действие на някои нискомолекулни вещества от групата на s-триазините.

## **Научни приноси с потвърдителен характер:**

- Потвърдена е експресията на клаудин-12 при туморни клетки с епителен произход, изолирани от бял дроб и дебело черво.

## **Научно-приложни приноси:**

- Участието на клаудин-12 в процесите на клетъчна миграция дава възможност за използването му като таргетен протеин за блокиране на туморните метастази при лечение на определени туморни заболявания или като диагностичен маркер за специфични тумори.



## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

**Kolchakova D**, Moten D, Batsalova T, Dzhambazov B. 2021. Tight junction protein claudin-12 is involved in cell migration during metastasis. *Biomolecules*, 11(5):636. <https://doi.org/10.3390/biom11050636>  
(импакт фактор за 2019 - 4.082, Q1)

Batsalova T, **Kolchakova D**, Dzhambazov B. 2018. *In vitro* cytotoxicity of cyanuric acid and selected derivatives. *Toxicol. Forensic Med. Open J.*, 3(1): 14-21. <http://dx.doi.org/10.17140/TFMOJ-3-125>

### *Участие в научни форуми във връзка с дисертацията*

**Kolchakova D.**, Dzhambazov B., Batsalova T. 2018. *In vitro* antitumor activity and immunophenotypic effects of selected S-triazine compounds. *Fifth National Congress of Immunology*, Plovdiv, Bulgaria, October 25-28, 2018.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам моята благодарност и признателност към научните ми ръководители проф. д-р Балик Джамбазов и доц. д-р Цветелина Бацалова за оказаната помощ при реализацията на настоящата работа. Признателна съм за всички предоставени възможности, високия професионализъм и непрестанната им подкрепа през годините. Именно те бяха онези вдъхновяващи личности и преподаватели, които събудиха любовта и интереса ми към клетъчната биология още в първите дни на моето студентство.

Изказвам благодарности и към всички преподаватели от катедра "Биология на развитието" за съдействието, всички възможности, свързани с професионалното ми израстване и топлата атмосфера по време на моята преподавателска и практическа работа.

Благодаря на моето семейство за нестихващата подкрепа и вяра в мен и моите способности!

И на последно, но не по значимост място, благодаря на моя син Стоил, че избра да се появи на бял свят при финализирането на този труд, като направи този период още по-специален и запомнящ се!

