

Вера Владимирова Гешева

Биологична активност на хемоцианини от
гастроподни организми

Автореферат

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

научна специалност: „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”

шифър: 01.05.10

София 2014

Дисертацията съдържа 153 страници и 40 фигури. Експерименталната работа е извършена в лаборатория „Експериментална Имунология” на Института по микробиология „Стефан Ангелов”, към Българската Академия на Науките и в лаборатория „Химия и биофизика на протеини е ензими” на Института по органична химия с център по фитохимия, към Българската Академия на Науките.

Вера Владимирова Гешева

Биологична активност на хемоцианини от
гастроподни организми

Автореферат

за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

научна специалност: „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”

шифър: 01.05.10

Научни ръководители: доц. д-р Красимира Идакиева
доц. д-р Андрей Чорбанов

Официални рецензенти: проф. д-р Нина Ивановска, дбн
доц. д-р Радостина Александрова

София, 2014

- Увод:

Хемоцианините са клас респираторни белтъци в мекотели и артроподи. Те са свободно разтворени в хемолимфата на тези животни и обезпечават снабдяването на тъканите и органите им с кислород, подобно на хемоглобина при бозайници. Големият им размер (4-8 МДа), ксеногенният им характер и високото въглехидратно съдържание са в основата на генерирания към тях силен имунен отговор при бозайниците, което от своя страна води до използването им като терапевтици в медицината. KLH (хемоцианин, изолиран от *Megathura crenulata*) е добре изучен имуностимулант, белтък-носител за малки хаптени молекули, както и анти-туморен препарат.

Ваксините са едно от най-успешните открития в историята на медицината. С развитието си ваксините стават все по-безопасни, но и по-слабо имуногенни и по-малко ефективни. Поради тази причина през миналия век са създадени и изследвани множество адюванти, като до сега алуминиевите деривативи са най-широко използваните адюванти в клиничната практика. Въпреки широката си употреба те причиняват редица странични реакции и усложнения след ваксинация. Всичко това показва нарастващата нужда от развитие на ефективни, безопасни, биоразградими и евтини за производство адюванти. Биоактивните субстанции са от изключителен интерес за клиничната практика, поради природния си произход и значително по-малкото странични и нежелани реакции. Такива вещества се използват като белтъци-носители, стимулиращи и усилващи имунния отговор към определен антиген в състава на различни ваксини. Сред тях хемоцианините са много обещаващи и ефективни биоадюванти, използвани с различни типове антигени. KLH е най-добре изученият представител от тази група, поставяйки стандарт за природен белтък-носител на хаптени, като заедно с това се използва и като анти-туморно средство. Той е предпочитан белтък-носител за въглехидратни антигенни епитопи в състава на редица разработвани в последното десетилетие анти-туморни ваксини.

Множество природни продукти се използват като анти-туморни терапевтици, насочващи и стимулиращи имунологичния отговор в борбата с различни видове рак. Хемоцианините имат потенциал и в качеството си на анти-туморно средство поради имуностимулаторните си характеристики и липсата на токсични странични ефекти след прилагането им. Терапията с KLH е утвърдена в клиничната практика в случаи на рак на пикочния мехур след хирургичното му отстраняване. Освен това все повече се увеличава броят на научните изследвания, анализиращи анти-туморния потенциал както на KLH, така и на други хемоцианини по отношение на други видове злокачествени заболявания.

Тема на настоящия дисертационен труд е анализирането на адювантните и имуностимулаторните свойства на хемоцианини, изолирани от черноморския рапан – *Rapana thomasi* (RtH), и от сухоземен охлюв - *Helix pomatia* (HpH), както и на

техния потенциален анти-туморен ефект *in vitro* – при различни ракови клетъчни линии и *in vivo* - в миша моделна система на рак на дебелото черво. Получените експериментални резултати от една страна разкриват възможността тези слабо изучени в имунологично отношение хемоцианинови молекули да бъдат прилагани като биоадюванти към вирусни или бактериални ваксини и от друга страна демонстрират ефективното им действие на неспецифични имуностимулатори с терапевтичен потенциал в миша моделна система на рак на дебелото черво.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ:

Целите на настоящия дисертационен труд включват:

1. Определяне на биоадювантния потенциал на два хемоцианина - RtH, изолиран от *Rapana thomasiana*, и HpH, изолиран от *Helix pomatia*, като компоненти в състава на моделни анти-бактериални и анти-вирусни неконюгирани ваксини.
2. Анализ на прекия цитопатичен анти-туморен ефект на двата хемоцианина *in vitro* върху различни миши и човешки ракови клетъчни линии и сравнително разглеждане на действието на RtH и HpH.
3. Проследяване на анти-туморния ефект на двата хемоцианина *in vivo* в миша моделна система на рак на дебелото черво. Сравнително разглеждане на ефектите от предварително сенсibiliзиране на експерименталните животни с хемоцианините, както и на прилагането на различни по интензитет и количества терапевтични подходи.

За постигането на целите бяха поставени следните задачи:

- ✓ Изолиране, пречистване и охарактеризиране на хемоцианини от гастроподните организми *Rapana thomasiana* и *Helix pomatia*.
- ✓ Инжектиране на експериментални групи от Balb/C мишки с RtH, HpH или с двата хемоцианина, комбинирани с вирусен или бактериален антиген.
- ✓ Проследяване на потенциала на двата хемоцианина да стимулират хуморален и клетъчен имунологичен отговор срещу собствените си молекули и срещу молекулите на моделните антигени в състава на неконюгираните моделни ваксини
- ✓ Определяне на про-апоптичния и анти-пролиферативния ефект на двата изследвани хемоцианина върху човешки и миши ракови клетки.
- ✓ Установяване на миша моделна система на рак на дебелото черво след инжектиране на различни количества C-26 карциномни клетки в Balb/C мишки.
- ✓ Определяне на ефекта от предварителното сенсibiliзиране с двата хемоцианина върху терапевтичния им потенциал в миша моделна система с индуциран рак на дебелото черво.
- ✓ Определяне на ефекта от провеждане на интензивна хемоцианинова терапия. Сравняване на ефекта от терапията при групи, третирани с 100 мкг

хемоцианин един път седмично, и групи, с проведена интензивна седемдневна хемоцианинова терапия, последвана от прилагането на десетократно по-големи терапевтични количества от RтН и НрН.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

Материали:

- ✓ Хемоцианини от *Megathura crenulata*, *Rapana thomasiana* и *Helix pomatia*
- ✓ Експериментални мишки от линия Balb/C
- ✓ Клетъчни линии: YAC-1, A20, Raji, Jurkat, NIH-3T3, C-26, MDCK
- ✓ Антитела и антигени (тетаничен токсид, Ip пептид и търговска анти-грипна ваксина Influvac).

Методи:

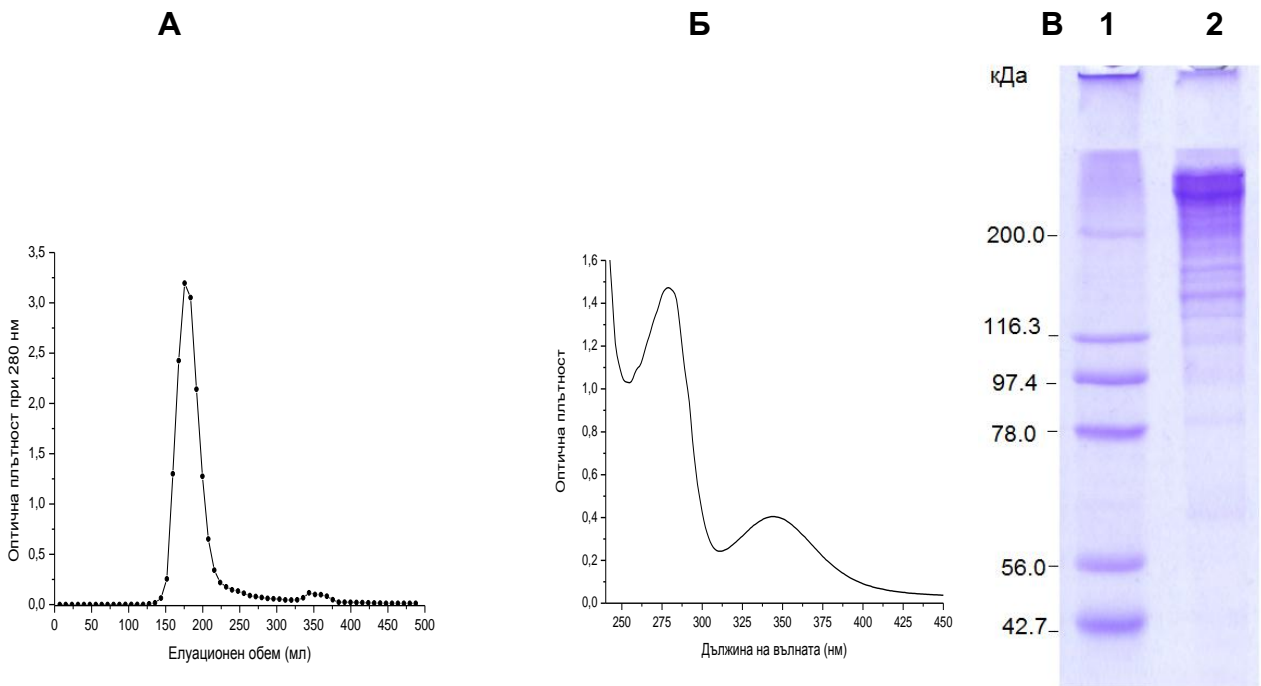
- ✓ Абсорбционна спектроскопия,
- ✓ SDS-PAGE електрофореза,
- ✓ Флоуцитометрия,
- ✓ Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA),
- ✓ Ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ (ELISPot),
- ✓ Колориметричен метод за отчитане на клетъчна пролиферативна активност;
- ✓ Светлинна микроскопия;
- ✓ Имуно-блот;
- ✓ Ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ (ELISPot) за определяне броя клетки, продуциращи антитела, срещу тетаничния токсид.

РЕЗУЛТАТИ:

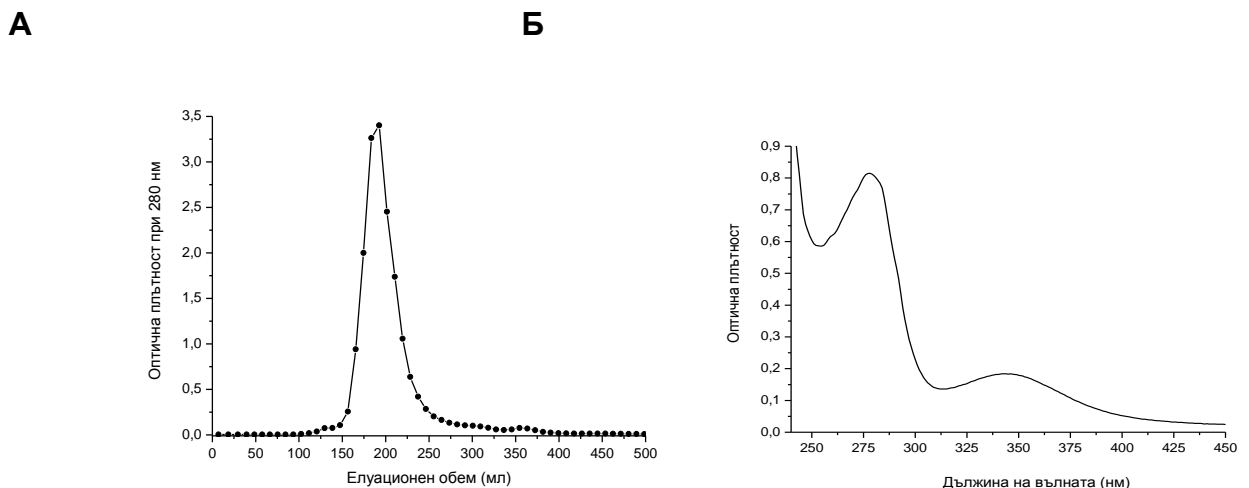
• Изолиране, пречистване и определяне на концентрацията на хемоцианини

Полученият след ултрацентрифугирането хемоцианин от рапана беше допълнително пречистен посредством молекулноситова хроматография. Протеинът беше елуиран като единичен симетричен пик, което е индикация за неговата молекулна хомогенност (фигура 1А). Абсорбционния спектър на изолирания хемоцианин е показан на фигура 1Б, а контролът върху чистотата на изолирания протеин се осъществява с помощта на електрофореза (фигура 1В).

Елуационните пикове и абсорбционните спектри на НрН са илюстрирани на фигури 2А и 2Б след направените анализи. Резултатите свидетелстват за много висока степен на пречистване и за запазени биологични функции на хемоцианините след процедурите по изолиране и пречистване.



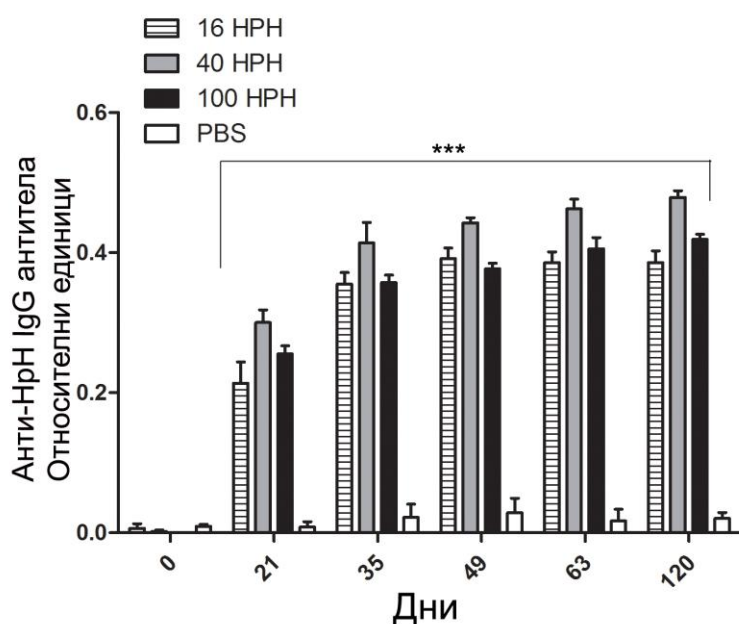
Фигура 1. А) Молекулноситова хроматография на RtH върху колона Sepharose 4B (90 x 2.4 см), еквилибрирана с 50 mM фосфатен буфер, pH 7.2. Скорост на елуиране 8 мл за 30 мин. Б) Абсорбционен спектър на хемоцианин изолиран от *Rapana thomasiana* В) 7.5% SDS-PAGE. Пътека 1, протеинови маркери със следните молекулни маси (отгоре надолу): миозин, (200 кДа); β -галактозидаза, (116.3 кДа); фосфорилаза b, (97.4 кДа); овотрансверин, (78 кДа); глутамат дехидрогеназа, (56 кДа) и овалбумин, (42.7 кДа). Пътека 2, пречистен хемоцианин.



Фигура 2. А) Молекулноситова хроматография на HrH върху колона Sepharose 4B (90 x 2.4 см), еквилибрирана и елуирана с фосфатен буфер, pH 7.2. Скорост на елуиране 8 мл за 30 мин. Б) Абсорбционен спектър на HrH.

- **Имуногенност на хемоцианините RtH и HpH**

Хемоцианините са белтъци с висока молекулна маса и високо процентно съдържание на въглехидрати, което създава предпоставки за тяхната силна имуногенност. Имуностимулаторните свойства на RtH са охарактеризирани и резултатите от тези изследвания са публикувани (Tchorbanov A et al, 2008). От тези експерименти става ясно, че RtH е силно имуногенна молекула, която провокира генерирането на хуморален имунен отговор след инжектиране в мишки, за което свидетелстват високите нива на анти-RtH антителата, образувани още след първата реимунизация с хемоцианина.



Фигура 3. Генериране на анти-хемоцианинови антитела след инжектиране на HpH. Групи от мишки бяха инжектирани с фосфатен буфер и три различни количества от хемоцианина. Животните бяха реимунизирани на 21вия и след това на 35тия ден, а серумните нива на анти-хемоцианиновите антитела бяха проследени 4 месеца след началото на имунизирането. Student t test (***) $p < 0.005$.

Имуностимулаторните свойства на хемоцианина изолиран от *Helix pomatia* също бяха доказани след инжектирането му в експериментални Vav/C мишки и последващ ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) на серумните проби, събирани от експерименталите животни. За определяне на оптималното количество хемоцианин бяха проследени три групи животни, инжектирани с различни дози от HpH (16, 40 и 100 мкг/мишка). Резултатите показаха синтез на високи нива анти-хемоцианинови IgG антитела още след първата имунизация, като те достигнаха максимума си след втората реимунизация. При анализа на резултатите получени от групите, инжектирани с три различни количества HpH се оказа, че най-високи нива на синтезираните анти-HpH антитела бяха наблюдавани

при използване на 40 мкг, като разликите между нивата и при трите количества е пренебрежимо малка (фигура 3).

- **Биоадювантни свойства на RtH:**

RtH беше анализиран в качеството си на биоадювант в състава на неконюгирани моделни анти-вирусни и анти-бактериални ваксини. Характерното за двата типа моделни ваксини, с които избрахме да работим е, че анти-вирусната ваксина съдържа малък по размер и слабо имуногенен антиген – хемаглуторинин (HA) от Инфлуенца вирус, докато анти-бактериалната ваксина съдържа значително по-голям по размери антиген – тетаничен токсид (ТТ). За сравнителна контролна група бяха използвани мишки, инжектирани с антиген в комбинация с KLH.

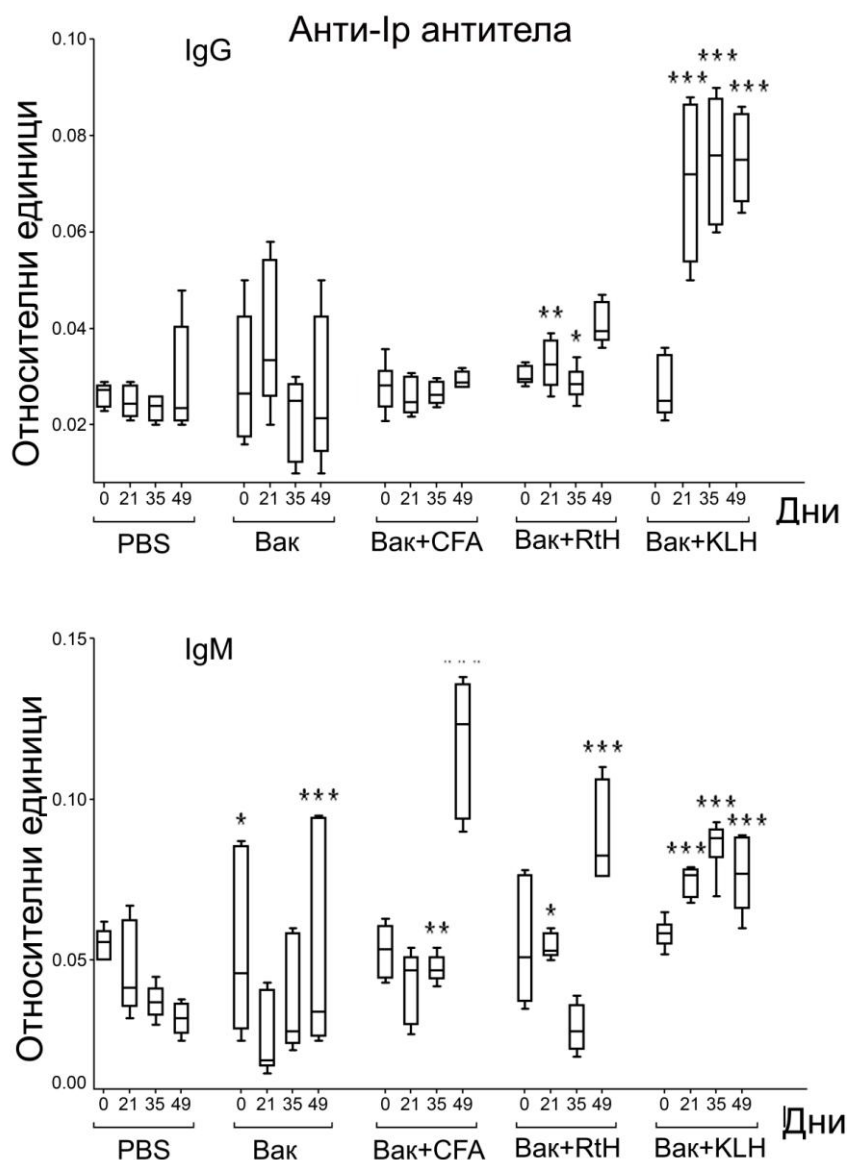
- ✓ ***Биоадювантни свойства на RtH в състава на анти-вирусна ваксина:***

Проследени бяха нивата на IgM и IgG антителата, разпознаващи капсидния белтък хемаглуторинин (HA) в състава на инфлуенца вируса. При анализ на специфичните IgM антитела резултатите при всички групи (Вак, Вак+CFA, Вак+RtH, Вак+KLH) освен контролната, инжектирана с PBS група, показаха статистически достоверно повишаване на тези нива. На 49-тия ден при групата Вак+RtH бяха наблюдавани нива по-високи дори и от групата, инжектирана с Вак+KLH.

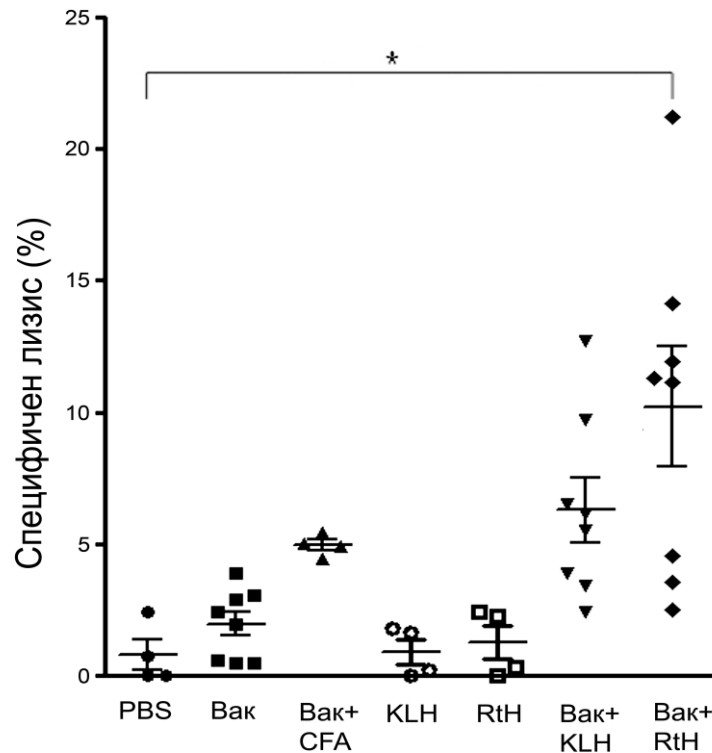
Резултатите от анализа на IgG антителата показаха синтез на високи нива в групата, инжектирана с Вак+KLH още след първата имунизация, като тогава беше достигнато и максималното ниво. Статистически достоверно повишаване беше отчетено само в тази група и групата, инжектирана с Вак+RtH, въпреки по-ниските нива достигнати при Вак+RtH. При инжектираната с анти-вирусната ваксина+RtH група отново беше наблюдавано повишаване след първата имунизация, като нивата бяха с близки стойности до последния отчетен период на 49-тия ден (фигура 4).

Биоадювантните свойства на RtH бяха анализирани и по отношение способността на този хемоцианин да провокира насочен, специфичен Т лимфоцитен цитотоксичен имуноен отговор срещу инфектирани с вирус клетки. За тази цел беше проведен цитотоксичен тест 3 месеца след последната реимунизация. За целта бяха използвани спленоцити, изолирани от експерименталните и контролните животни (ефекторни клетки) и вирусно-заразени 3Т3 миши фибробласти (прицелни клетки). Резултатите показаха, че в групите инжектирани с PBS, Вак, KLH и RtH нивата на генерираните цитотоксични Т лимфоцити са пренебрежимо ниски. В групата, инжектирана с Вак+CFA беше наблюдавана специфична цитотоксична активност (5%). При групата, третирана с Вак+KLH бяха наблюдавани по-високи нива (7.5%) на предизвикания специфичен лизис, като те бяха близки до тези на групата, инжектирана с Вак+CFA. Значително

по-високи стойности – повече от 10% специфичен лизис на прицелните клетки бяха отчетени при групата, инжектирана с Вак+RtH (фигура 5).



Фигура 4. Серумни нива на анти-Ip антитела при мишки, имунизирани с PBS или с 15 мкг от търговска анти-грипна ваксина приложена самостоятелно или в комбинация с Пълен Адювант на Фройнд, RtH или KLH. Мишките са реимунизирани на 21вия и 35тия ден след първата имунизация. Резултатите са получени след ELISA анализи и са представени като относителни единици, изчислени според стандартна права построена от резултати, получени от стандартни разреждания на поликлонални анти-Ip антитела. Student t test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.005$)**



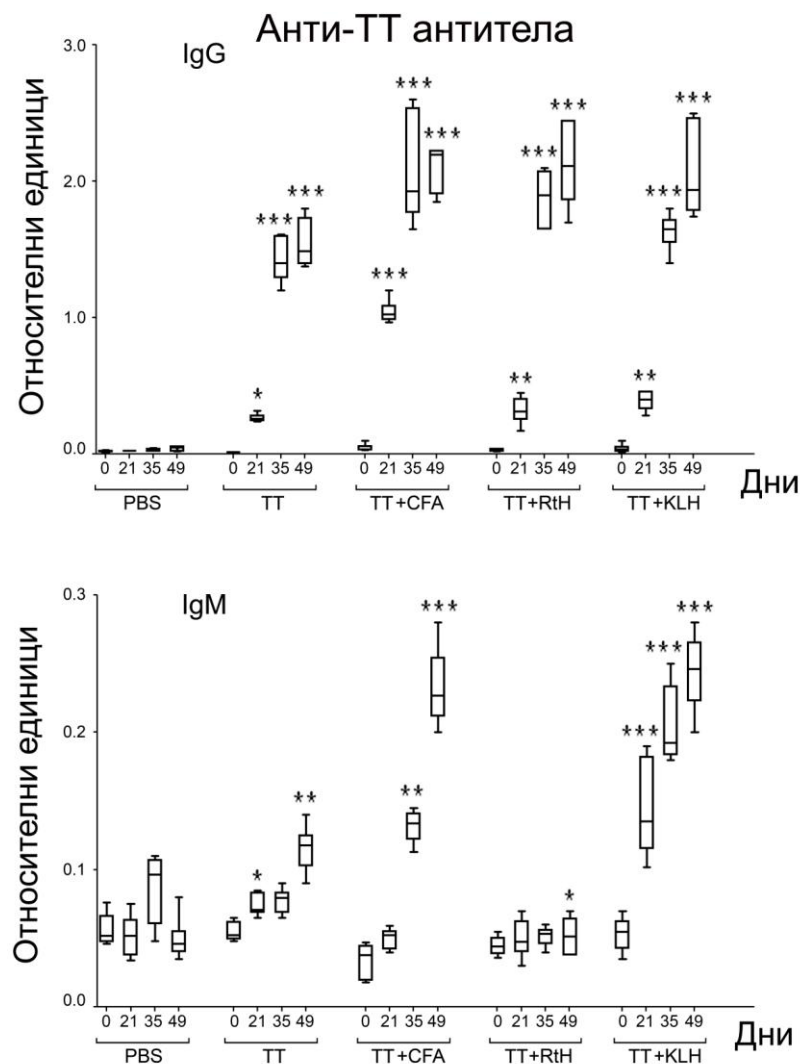
Фигура 5. Цитотоксична активност на спленоцити, изолирани от експерименталните групи 6 месеца след първата имунизация. ЗТЗ клетки заразени с инфлуенца вирус бяха култивирани с ефекторните спленоцити в съотношение 1:40 за 4 часа, 37°C. Концентрацията на лактат дехидрогеназата отделена в културалната среда в следствие на лизиране на прицелните клетки беше определена посредством търговски кит за определяне на специфична цитотоксичност. Всяка точка от фигурата представя резултат от индивидуално животно, като част от експерименталната група. Статистическата достоверност е изчислявана спрямо резултата за контролните мишки, инжектирани само с PBS. * $p < 0.05$; Student t-test.

✓ **Биоадювантни свойства на RtH в състава на анти-бактериални ваксини.**

За да определим биоадювантните качества на RtH хемоцианина в състава на неконюгирана анти-бактериална ваксина групи от мишки бяха инжектирани с ТТ, комбиниран с RtH и други видове адюванти.

Инжектирането на Balb/C мишки с PBS, ТТ, ТТ+CFA, ТТ+KLH и ТТ+RtH доведе до слаба продукция на анти-ТТ IgM антитела в групите, инжектирани с PBS, ТТ, и ТТ+RtH. В групата инжектирана с бактериалния токсин в комбинация с пълен адювант нивата на анти-ТТ IgM антителата бяха повишени след първата реимунизация, като достигнаха максимума си след последната реимунизация. Най-високи нива на IgM-титрите бяха постигнати в групата, инжектирана с ТТ+KLH. В този случай нивата се покачваха прогресивно след всяко следващо въвеждане на ваксината (фигура 6).

Нивата на синтезираните анти-тетанични IgG антитела бяха значително по-високи в сравнение с IgM нивата. След ELISA анализ на серумните проби резултатите показаха високи стойности на продуцираните анти-ТТ антитела още след първата реимунизация в групите ТТ, ТТ+СFA, ТТ+KLH и ТТ+RtH. В този период RtH показва по-добри адюванти качества в сравнение с KLH. Максималните достигнати стойности в тези групи се наблюдават след втората реимунизация. Нивата достигнати в групите, инжектирани с токсид и хемоцианини са изключително близки по стойностите след първата реимунизация с групата, инжектирана с токсид в пълен адювант.



Фигура 6. Нива на анти-ТТ IgG и IgM антитела, продуцирани след инжектиране на ТТ, приложен със или без адювант. Мишките бяха инжектирани интраперитонеално с PBS или с 20 мкг ТТ, приложен самостоятелно или комбиниран с пълен адювант (ТТ+СFA). Две други групи бяха имунизирани с ТТ, комбиниран със 100 мкг RtH или KLH. Групите бяха реимунизирани на 21-вия и 35-тия ден със същите дози. Серумни проби бяха събирани преди всяко имунизирание и 15 дни след последното инжектиране.

Резултатите са представени като Относителни единици изчислени с помощта на стандартни поликлонални IgG и IgM антитела срещу ТТ. Резултатите от тези стандартни разреждания бяха използвани при построяването на стандартна права. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; Student *t*-test.

Сравнително високите нива в групата инжектирана с ТТ са обясними, като се има предвид големината и ксеногенността на бактериалната молекула. В трите групи, при които има въвеждане на токсид в комбинация с адювант (CFA, KLH или RтН) се наблюдава синергизъм между ТТ и адювантите по отношение на нивата на анти-ТТ антителата.

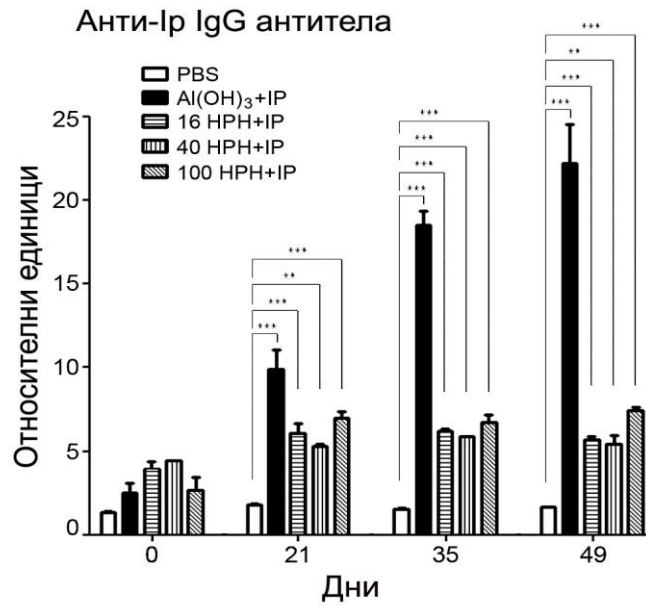
- **Биоадювантни свойства на НрН**

НрН беше разгледан в качеството си на биоадювант към две различни моделни ваксини без химично конюгиране между хемоцианинът и антигените. Антигенът въведен със стандартно използван адювант (Al(OH)₃) беше използван за имунизация на група Balb/C мишки, с която да бъдат сравнявани другите експериментални групи, инжектирани с антигена и три различни количества (16, 40 и 100 мкг) от анализирания хемоцианин.

- ✓ ***Биоадювантни свойства на НрН в състава на анти-вирусна ваксина***

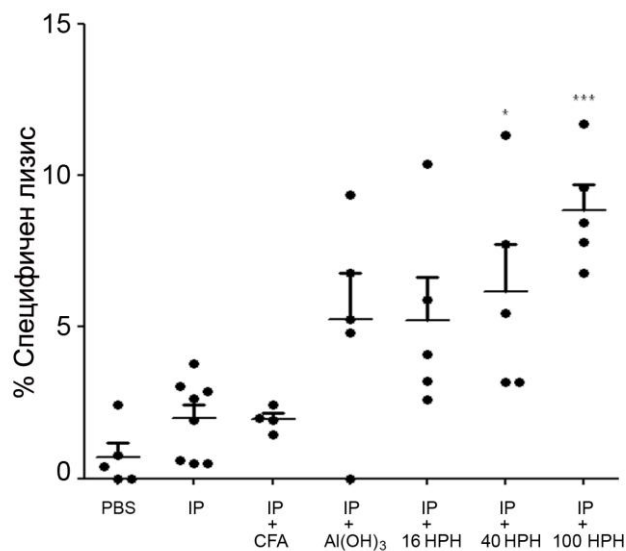
След прилагане на схема на имунизация, включваща имунизация (ден 0) и две последващи реимунизации (ден 21, ден 35) беше анализиран потенциала на хемоцианина от *Helix pomatia* да индуцира както Th1-, така и Th2-зависим имунен отговор срещу моделен антигенен пептид (Ip) от капсидния хемаглутинин в състава на инфлуенца вируса. Ip-пептидът притежава вградени B и T-клетъчни епитопи, което позволява стимулирането както на хуморален, така и на клетъчно-зависим имунитет.

Резултати от проведени ELISA анализи на серумни проби от експерименталните групи показаха повишаване нивата на анти-Ip IgG антителата след всяка следваща имунизация единствено в групата, имунизирана с антигена, комбиниран с Al(OH)₃. Въпреки значително по-високите нива на анти-Ip IgG антителата в тази група при групите, инжектирани с пептида, комбиниран с трите различни количества НрН също беше отчетено статистически достоверно повишаване на нивата на имуноглобулиновия титър (фигура 7).



Фигура 7. Нива на IgG антителата, специфични срещу Ip пептида в състава на търговска анти-грипна ваксина. Резултатите са получени след инкубиране на серумни проби от всички експериментални групи в микротитрационни плаки, натоварени с химерна молекула BSA-Ip пептид. Резултатите са представени като относителни единици. Student t test, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Потенциалът на HPH да провокира специфичното лизиране на вирусно-заразени прицелни клетки посредством генериране на специфични цитотоксични Т лимфоцити беше анализиран по описания по-горе начин.



Фигура 8. Цитотоксична активност вследствие инжектиране на Balb/C мишки с Ip пептид, въведен с различни адюванти.. Миши 3T3 фибробласти заразени с

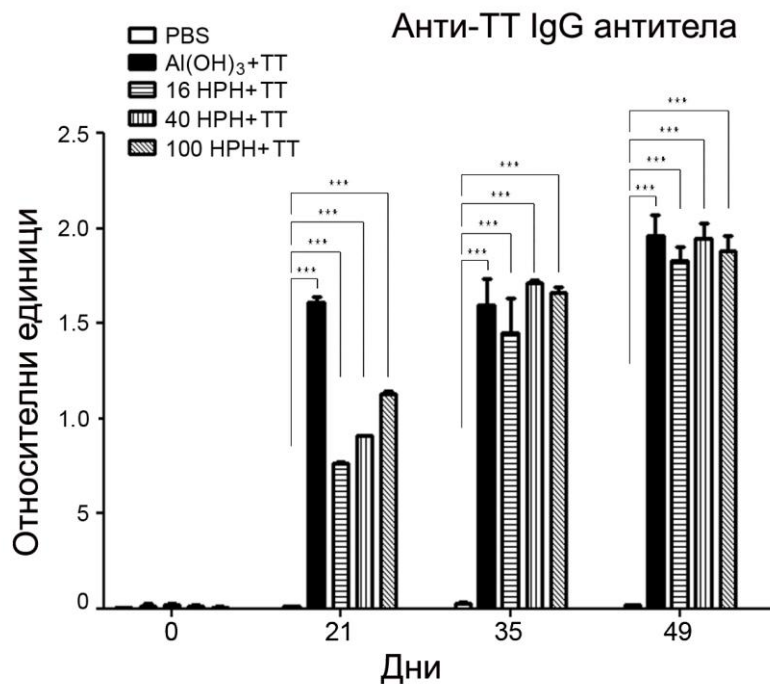
инфлуенца вирус (прицелни клетки) бяха инкубирани с ефекторните спленоцити. Концентрацията на лактат дехидрогеназата, отделена в културалната среда в следствие на лизиране на прицелните клетки беше определена посредством търговски кит за определяне на специфичната цитотоксичност. Всяка точка от фигурата представя резултат от индивидуално животно, като част от експерименталната група. Статистическата достоверност е изчислявана спрямо резултата за контролните мишки, инжектирани само с PBS. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$; Student t-test.

От резултатите става ясно, че специфичен лизис има във всички групи, инжектирани с вирусния пептид в присъствие на адювант, като изключение прави само групата имунизирана с пептид в пълен адювант на Фройнд, където процента на специфичен лизис е съизмерим с контролната PBS група. За разлика от това при животните третирани с пептид, комбиниран с $Al(OH)_3$ и пептид комбиниран с двете по-малки количества НрН (16 и 40 мкг) процента на лизиса се увеличава. Най-високи стойности се наблюдават в групата имунизирана с Ip пептид в присъствие на 100 мкг хемоцианин (фигура 8).

✓ **Биоадювантни свойства на НрН в състава на анти-бактериални ваксини.**

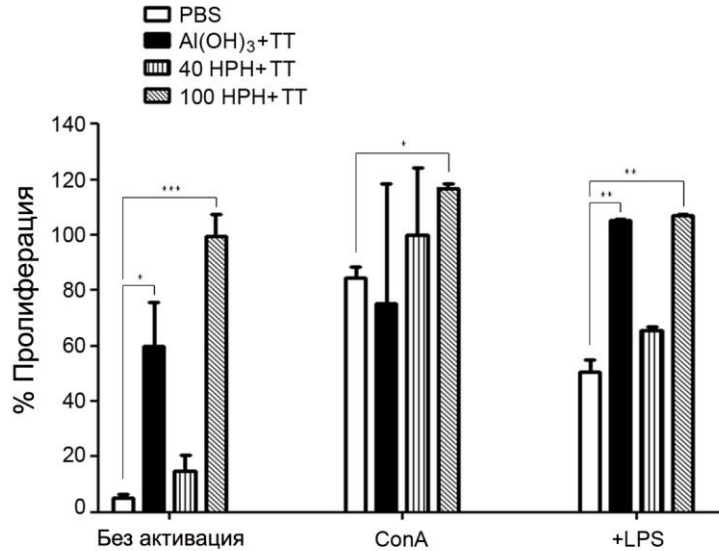
В тази група експерименти ТТ беше използван отново като моделен бактериален антиген. Установено беше, че всички групи с изключение на контролната инжектирана с фосфатен буфер група, развиват високи нива от анти-ТТ IgG антитела. При групите имунизирани с бактериалния токсид и трите различни количества от НрН имуноглобулиновите нива се повишават и след първата реимунизация достигат нива, близки до тези на групите инжектирани с ТТ, комбиниран с $Al(OH)_3$ (фигура 9).

За по-детайлен анализ на имуностимулаторните способности на НрН беше изследвана способността му да въздейства върху пролиферативната активност на Б и Т лимфоцити, както и върху способността за генериране на плазматични клетки секретирани антитела, специфични към ТТ. За да проследим пролиферативната активност на Б и Т лимфоцитите изолирани от животни от експерименталните групи, инжектирани с PBS, ТТ+ $Al(OH)_3$, ТТ+НрН 40 мкг и ТТ+НрН 100 мкг беше проведен МТТ анализ. Конканавалин А (ConA) и липополизахарид (LPS) бяха използвани в експеримента, респективно като Т- и Б-клетъчни активатори.

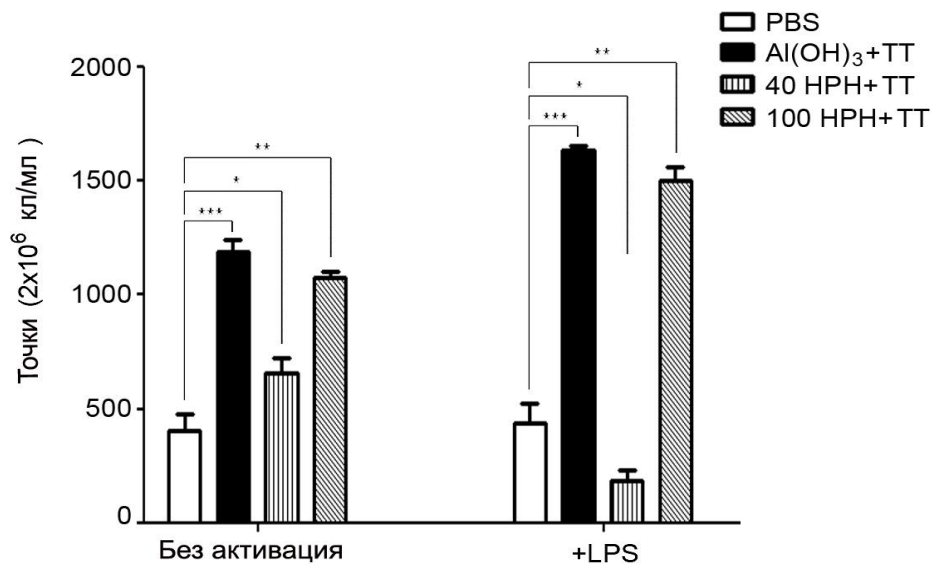


Фигура 9. Нива на генерираните IgG антитела, разпознаващи тетаничния токсид. Групи от мишки инжектирани с ТТ, комбинирано приложен с Al(OH)₃ или с три различни количества от НрН (16, 40 и 100 мкг/мишка) бяха анализирани по отношение на нивата на образуваните срещу токсоида антитела. Резултатите от ELISA анализите са представени като Относителни единици, изчислени спрямо права, получена от стандартни разреждания на поликлонални анти-ТТ антитела. Student t test (***) $P < 0.005$.

Резултатите показаха, че при липса на допълнителни активиращи фактори инкубацията на спленоцити от животните, инжектирани ТТ+Al(OH)₃ се характеризира със сравнително висока пролиферативна активност. Клетките изолирани от двете групи третирани с токсид и двете количества от хемоцианина проявиха различна активност. При спленоцити изолирани от групата инжектирана с ТТ+НрН 100 мкг отново беше наблюдавана висока степен на пролиферация, по-висока дори от ТТ+Al(OH)₃, докато при групата ТТ+НрН 40 мкг пролиферативната активност е съизмерима с тази, наблюдавана при контролната група. След инкубация с Конканавалин А нивата на клетъчно делене в тези две групи (PBS и ТТ+НрН 40 мкг) значително се повишават, докато при ТТ+Al(OH)₃ и ТТ+НрН 100 мкг нивата се повишават по-слабо, което говори за предварителна активация на Т-клетъчната популация. Подобна е ситуацията и след инкубация на спленоцитите с LPS. Рязко се повишава нивото на пролиферация при групите PBS и ТТ+НрН 40 мкг, докато при останалите две групи наблюдаваме слабо увеличаване в тези нива. Видимо е, че и при трите типа инкубация спленоцитите изолирани от група ТТ+НрН 100 мкг показват най-високи стойности на пролиферативна активност (фигура 10).



Фигура 10. Пролиферативна активност на спленоцити изолирани от групи мишки, инжектирани с ТТ+Al(OH)₃ или с ТТ, приложен с две различни количества от НрН (40 и 100 мкг/мишка). Степента на пролиферация беше анализирана както при липса на допълнителни стимули, така и при добавяне на Т (ConA) и Б (LPS) клетъчни активатори. Резултатите от експерименталните групи бяха сравнени с резултатите при контролната, нетретирана група. Two way ANOVA test, *p<0.05; **p<0.01; *p<0.005.**



Фигура 11. Ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ (ELISpot) за определяне броя клетки, продуциращи антитела срещу тетаничен токсид. Спленоцити от животни инжектирани с ТТ+Al(OH)₃ или с ТТ, приложен с две различни количества от НрН (40 и 100 мкг/мишка) бяха култивирани в присъствието на Б-клетъчен активатор или при липса на допълнителни стимули върху нитроцелулозна мембрана, след което беше анализиран броя на получените точки, отговарящи на

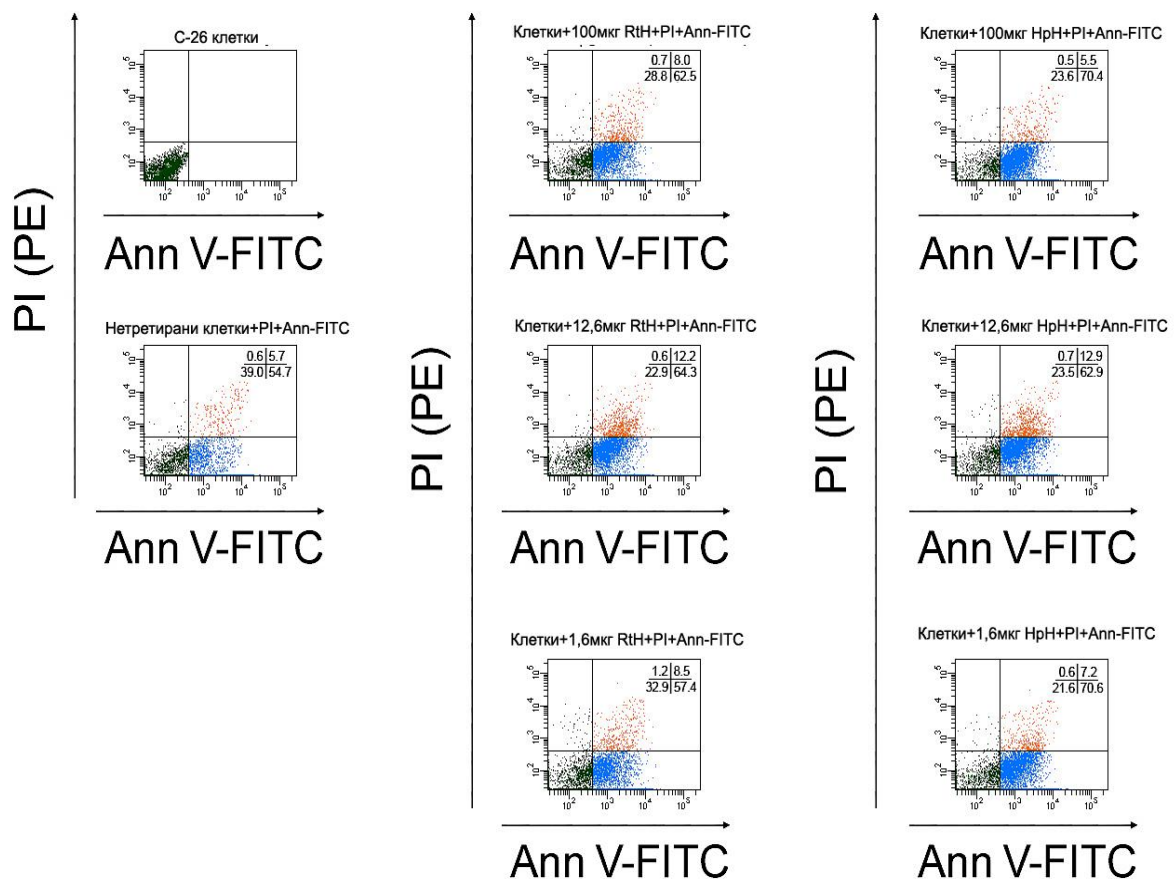
единична антитяло-секретираща плазматична клетка в отделните експериментални групи. Резултатите бяха сравнявани с резултатите от контролна нетретирана група. Two way ANOVA test, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Резултатите получени от изследването на пролиферативната активност се потвърдиха и след анализ за наличието на специфични плазмоцити, секретирани анти-ТТ антитела. Резултатите от ензимно-свързан имуносорбентен точков анализ разкриха по-високи стойности в броя точки, представящи индивидуални антитяло-секретиращи плазмоцити при групите инжектирани с ТТ+Al(OH)₃ и ТТ+HrH 100 мкг в сравнение с групите, инжектирани с PBS и ТТ+HrH 40 мкг както при инкубацията с липополизахарид, така и при инкубацията без допълнителни стимули. След инкубирането с LPS стойностите бяха повишени при групите ТТ+Al(OH)₃ и ТТ+HrH 100 мкг, което показва, че не всички специфични за ТТ плазмоцити секретират активно антитела (фигура 11).

- **Цитотоксичен ефект на RtH и HrH върху ракови клетъчни линии:**

След инкубация на миши и човешки лимфомни клетъчни линии Raji, Jurkat, A20 и YAC-1 с различни количества от двата хемоцианина (1.6, 12.6 и 100 мкг) не открихме промяна нито в нивата на апоптозата, нито в пролиферативната активност на клетките. Различни резултати бяха отчетени след инкубация на двата хемоцианина с миши карциномни клетки от рак на дебелото черво (C-26 клетъчна линия). И при трите инкубационни периода (24, 48 и 72 часа) резултатите показаха повишаване на процента индуцирана апоптоза, като най-големи разлики бяха наблюдавани след 72-часова инкубация (фигура 12). След инкубиране с RtH процентът на интактните клетки (39%) (Ann-PI-), измерен при контролните клетки намаля за сметка на нарастване на процента на ранната и късната апоптоза. При клетките инкубирани с 1.6 мкг RtH наблюдавахме нарастване от 2.7% на ранната апоптоза и 2.8% на късната апоптоза; при клетките инкубирани с 12.6 мкг RtH промените бяха съответно увеличение с 9.6% в ранната и 6.5% в късната апоптоза; след инкубация с 100 мкг RtH ранната апоптоза беше нарастнала с 7.8%, а късната – с 2.3%.

При инкубиране с HrH беше наблюдаван още по-ясно изразен про-апоптичен ефект. След 72-часово инкубиране с 1.6 мкг HrH ранната апоптоза беше увеличена с 15.9%, а късната – с 1.5%; инкубиране с 12.6 мкг HrH доведе до увеличение на процента ранна апоптоза с 8.2% и на процента късна апоптоза със 7.2%. При инкубация със 100 мкг HrH процента на ранната апоптоза нарастна с 15.7%, докато този на късната остана непроменен. И при двата използвани хемоцианина не беше наблюдаван дозо-зависим ефект.



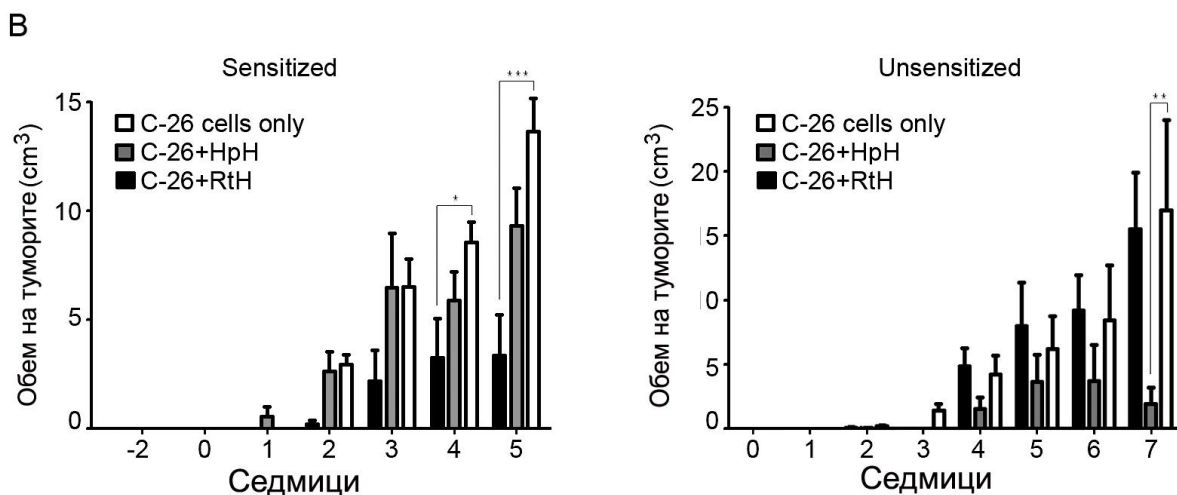
Фигура 12. RтН и НрН хемоцианините индуцират апоптоза в C-26 карциномни клетки *in vitro*. C-26 клетките бяха инкубирани с три различни концентрации на RтН и НрН (100 мкг/мл, 12.6 мкг/мл и 1.6 мкг/мл) за 72 часа на 37⁰C/5% CO₂. В края на култивирането клетките бяха белязани с AnnexinV-FITC и PI и бяха анализирани с проточен цитометър. Процентите на клетките, позитивни по някое от двете багрила са посочени в горния, десен ъгъл на панелите. Резултатите са представителни от 3 независими експеримента.

• **Анализ на ролята на предварителното сенсibiliзиране с RтН и НрН за ефективността на анти-туморната хемоцианинова терапия**

Беше изследван ефекта от предварителното третиране на експерименталните животни с двата изследвани от нас хемоцианина върху анти-туморната активност. Групите претретиращи с двата хемоцианина преди въвеждането на туморните клетки по-надолу в текста ще бъдат отбелязвани като SensRтН и SensНрН.

✓ **Ефект от хемоцианиновата терапията върху скоростта на нарастване на солидните тумори**

Ефектът от хемоцианиновата терапия беше анализиран по отношение на скоростта на нарастване на размерите на солидните тумори при животните.

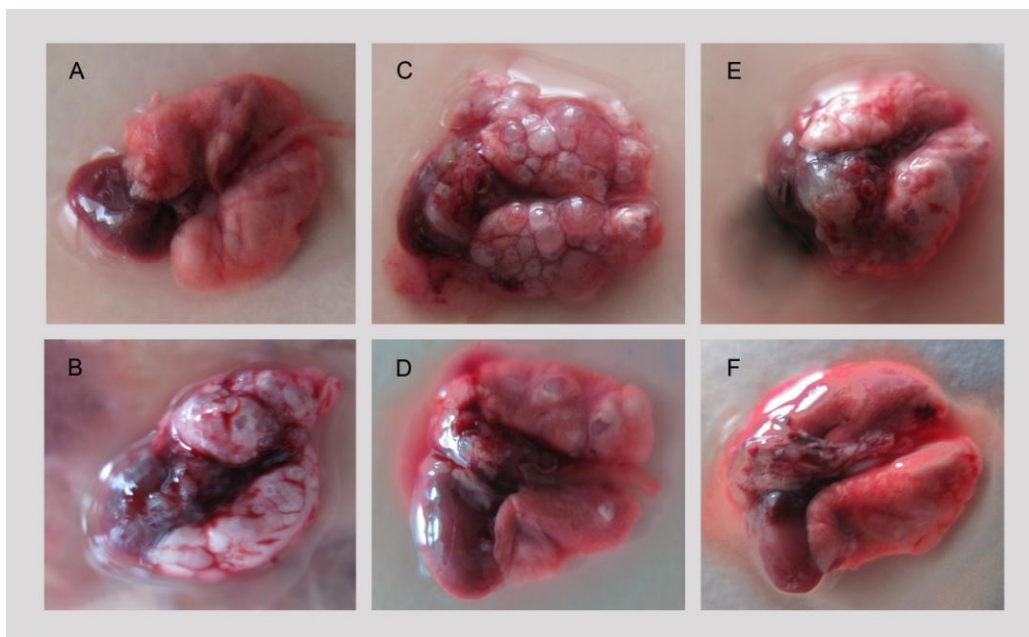


Фигура 13. Големина на солидните тумори при разглежданите терапевтични подходи. Динамиката на нарастване на туморите беше проследена във всички експериментални групи и сравнена с контролната група (инжектирани с C-26 клетки, без приложена терапия). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student t test.

Резултатите, представени във фигура 13 отчитат статистически достоверно намаляване в размерите на солидните тумори в групата, претретирана с RtH и в групата с HpH терапия без сенсibiliзиране (фигура 13).

✓ **Ефект от хемоцианиновата терапия върху формиране на метастази в белите дробове на експерименталните мишки**

Появата на метастази в белите дробове на експерименталните животи корелира с тежестта на засягане на целия организъм от злокачественото заболяване. Появата им се свързва с крайните етапи от заболяването и е показателна за напредналия стадий, в който се намира. Изолирани бяха бели дробове от най-малко 3 мишки от всички експериментални групи и бяха анализирани за наличие на метастазни образувания. Резултатите от това са представени на фигура 14, като оценката на степента на проява беше оценена по скала (без метастази; 1-3 метастазни образувания; 3-5 метастазни образувания; < 5 метастазни образувания).



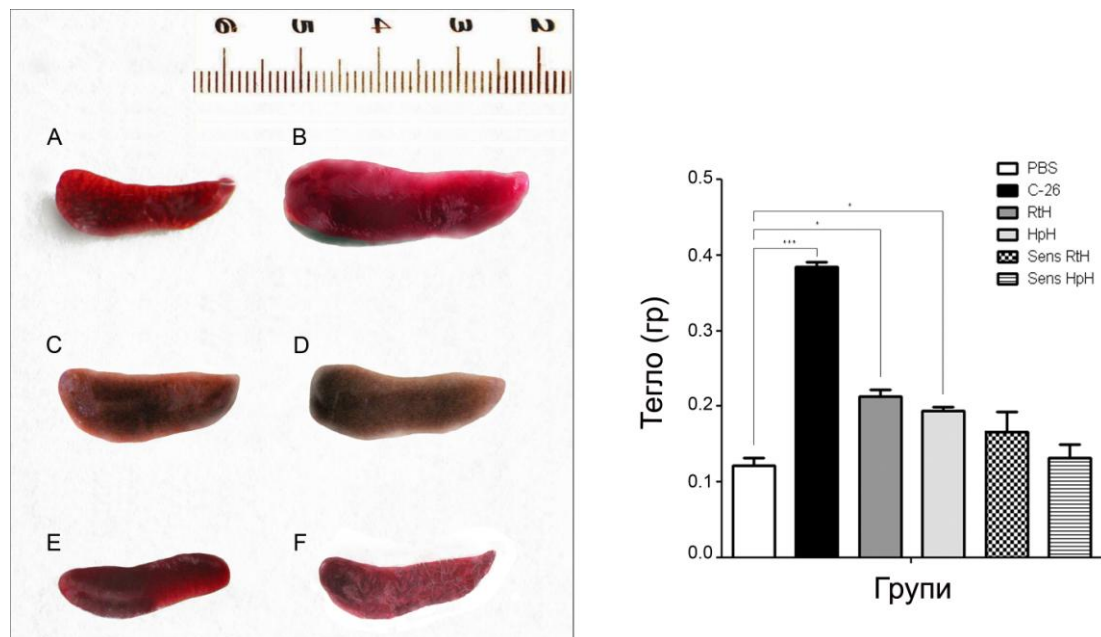
Фигура 14. Сравнителен анализ за формиране на микрометастази в белите дробове на Balb/C мишки с предизвикан рак на дебелото черво. Сравняваните групи са A) здрави мишки без C-26 клетки; B) мишки инжектирани с C-26 клетки без допълнителна терапия; C) мишки инжектирани с C-26 клетки и третирани с RtH; D) мишки инжектирани с C-26 клетки и третирани с HpH; E) мишки предварително сенсibiliзирани с RtH, инжектирани с C-26 клетки и третирани с RtH и F) мишки предварително сенсibiliзирани с HpH, инжектирани с C-26 клетки и третирани с HpH. Резултатите са представителни от поне три отделни експеримента.

При три от третираните с хемоцианини групи (SensRtH, SensHpH и HpH) броят на метастазните образувания беше по-малък от този на нетретираните животни. Нещо повече, при животните от SensHpH групата метастази изобщо не бяха открити. При SensRtH групата броят на регистрираните метастази беше между 1 - 3 и в трите изследвани животни. Белите дробове на животните третирани с HpH без предварително сенсibiliзиране бяха по-силно засегнати (между 3-5 метастазни образувания) от тези на SensRtH и SensHpH групите. Единствено при групата, третирана с RtH без предварително въвеждане на хемоцианина метастазните образувания формирани в белите дробове бяха съизмерими по брой (< 5) с тези от контролната група мишки, инжектирана с C-26 клетки и третирана с фосфатен буфер.

✓ **Ефект от различните терапевтични подходи върху големината на слезката при експерименталните групи**

Спленомегалията е характерен белег при C-26 индуцирания модел на рак на дебелото черво (Aulino P et al, 2010). Като ефект от терапевтичния потенциал на

хемоцианините беше проследена степента на уголемяване на слезките в различните експериментални групи.

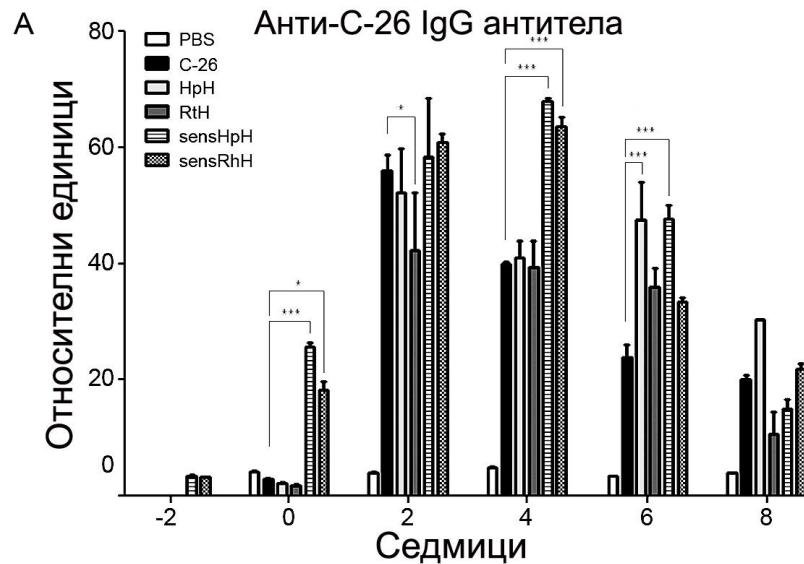


Фигура 15. Сравнителен анализ на спленомегалията при Balb/C мишки с предизвикан рак на дебелото черво. Ляв панел: сравняваните групи са А) здрави мишки без инжектирани C-26 клетки; В) мишки инжектирани с C-26 клетки без допълнителна терапия; С) мишки инжектирани с C-26 клетки и третирани с RtH; Д) мишки инжектирани с C-26 клетки и третирани с HpH; Е) мишки предварително сенсibiliзирани с RtH, инжектирани с C-26 клетки и третирани с RtH и F) мишки предварително сенсibiliзирани с HpH, инжектирани с C-26 клетки и третирани с HpH. Резултатите са представителни от поне три отделни експеримента. **Десен панел:** Разлики в теглото на изолираните от експерименталните групи слезки Two way ANOVA test, (* $p < 0.05$; *** $p < 0.005$)

Наблюдавано беше увеличаване на размерите на слезките при контролната група животни с рак на дебелото черво в сравнение с размерите на слезките, изолирани от здрави животни. При двете групи от мишки, третирани с RtH и HpH след въвеждането на раковите клетки беше наблюдавано намаляване на степента на спленомегалия, в сравнение с нетретирани контролни мишки. Още по-силно изразен ефект беше наблюдаван в групите с предварително сенсibiliзиране с хемоцианини. Там размерите на слезките бяха съизмерими с размерите на органите от здравите животни (фигура 15).

✓ **Ефект от проведените терапевтични подходи върху генерирането на антитела срещу C-26 карциномни клетки**

ELISA анализи на серумните проби от експерименталните животни показаха генерирането на антитела, разпознаващи карциномните клетки във всички групи от мишки, инжектирани с C-26 клетки и развили в следствие злокачествено заболяване. От фигура 16 става ясно, че при контролната група инжектирана с карциномни клетки без допълнително третиране (C-26 групата) синтеза на тези антитела започва след въвеждането на раковите клетки и достига максимални нива на втората седмица след инокулацията.

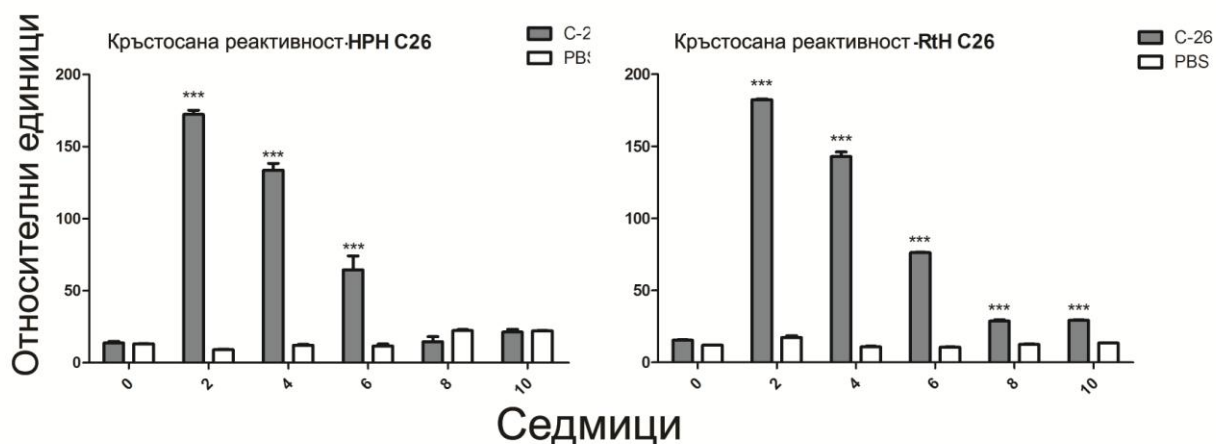


Фигура 16. Определяне нива на антитела разпознаващи C-26 карциномните клетки. Нивата на анти-C-26 IgG антителата в серумите на мишки бяха определени чрез ELISA. Мишки инжектирани с C-26 клетки или мишки, инжектирани само с PBS бяха използвани за контроли. Експерименталните групи бяха сравнявани с мишките, инжектирани само с C-26 клетки без допълнителна терапия. Резултатите са представени като относителни единици (RU). Two-way ANOVA test (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

След този етап с развитието и нарастването на солидните тумори нивата на антителата започват да намаляват. Нивата на генерираните срещу C-26 антитела бяха максимално високи 2 седмици след въвеждане на клетките и намаляваха с развитието на тумора. При тези две групи беше отчетено подържане на по-високи антитялови нива в сравнение с C-26 групата до края на анализирания период. При групите претретирани с HpH и RtH генерираните анти-C26 антитела се появяват още преди въвеждането на карциномните клетки в мишките. Нивата им се повишиха и достигнаха максималните си стойности на четвъртата седмица след инокулацията на C-26 клетките за разлика от другите групи, при които на този етап беше отчетено намаляване на тези стойности. След четвъртата седмица нивата на антителата започнаха да намаляват успоредно с развитието на заболяването (фигура 16).

✓ **Кръстосана реактивност между C-26 карциномни клетки и изследваните хемоцианини.**

За да проверим дали генерирането на анти-карциномни антитела преди въвеждането на C-26 клетките се дължи на наличието на общи епитопи между раковите клетки и хемоцианините проведохме ELISA тест, като използвахме серумни проби от контролната група мишки, инжектирани с карциномни клетки без хемоцианинова терапия.



Фигура 17. Кръстосана реактивност между C-26 карциномни клетки и изследваните RtH и HpH. Серуми от мишки инжектирани с C-26 карциномни клетки без допълнителна терапия или от здрави мишки бяха инкубирани в плаки, натоварени с двата хемоцианина. Резултатите от ELISA анализа са представени като анти-RtH или HpH IgG антитела като относителни единици. Two-way ANOVA test (*) $p < 0.001$.**

Резултатите от този анализ показаха висока степен на кръстосана реактивност между карциномните клетки и двата изследвани хемоцианина. Нивата на антителата, разпознаващи RtH и HpH, но генерирани в следствие на инжектирането с раковите клетки достигат максималните си стойности на втората седмица след въвеждането на клетките (фигура 17).

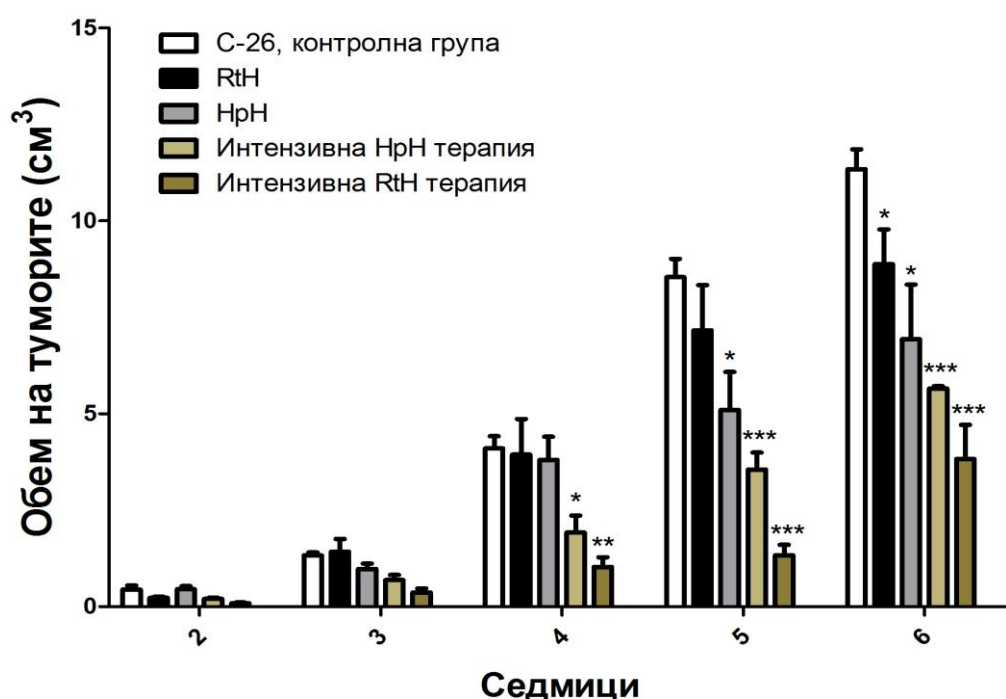
- **Анализ на интензитета на въвеждане на RtH и HpH върху ефективността на анти-туморната хемоцианинова терапия**

Анализирани и сравнени бяха два различни терапевтични подхода на терапия с RtH и HpH. Първият подход включваше терапия с по-ниски дози от хемоцианините (100 мкг/мишка), провеждана един път седмично, като терапията започна след образуване на солидни туморни маси в хълбоците на мишките. Групата от мишки третирани по тази схема с RtH ще бъде наричана за по-кратко RtH група, а групата третирана с HpH по тази схема ще бъде наричана HpH група. При втория терапевтичен подход беше проведена интензивна седем дневна хемоцианинова терапия (100 мкг/мишка), която започна един ден след въвеждане на раковите клетки. След това терапията беше продължена с инжектиране на 1 мг

хемоцианин /мишка един път седмично интратуморно за период от 4 седмици. Тези групи от мишки ще бъдат означени като група с интензивна RtH терапия и група с интензивна HpH терапия

✓ **Ефект от проведените терапии върху големината на солидните тумори**

Проследени бяха размерите на образуваните солидни тумори в различните експериментални групи. От фигура 18 става ясно, че развитието и нарастването на солидните тумори при третираните с хемоцианините мишки е забавено в сравнение с нетретираната група, развиваща рак на дебелото черво. При сравнение на двата терапевтични подхода се наблюдава, че интензивната терапия с двата хемоцианина води до значително забавяне в нарастването на туморната маса. При RtH и HpH групите беше наблюдавано забавяне в нарастването на солидните тумори през последните две седмици от проследения период. Ефект от тази терапия не беше наблюдаван през първите четири седмици от третирането. При групите с интензивна терапия мишките инжектирани с HpH демонстрираха по-силно изразен ефект на дългосрочно потискане развитието на туморите през целия период на наблюдение в сравнение с мишките, инжектирани с RtH.



Фигура 18. Динамика на увеличение на обема на солидните тумори в различните експериментални групи. Мишките бяха проследени за период от 6 седмици, като размерите за всяка група са представени като средно аритметична стойност от сумата на обемите на индивидуалните животни в групата за конкретната седмица. Two way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.005$).**

✓ **Ефект от проведените терапии върху спленомегалията**

Беше анализирана големината на слезките при групите от мишки с приложена интензивна хемоцианинова терапия, както и при групите, инжектирани с по-малки количества RtH и HpH. На фигура 19 е показано, че интензивната хемоцианинова терапия води до запазване на нормалните размери на слезките в значителна степен. Ефективността на хемоцианиновата терапия с по-малки дози е по-слабо изразена по отношение на следения параметър.



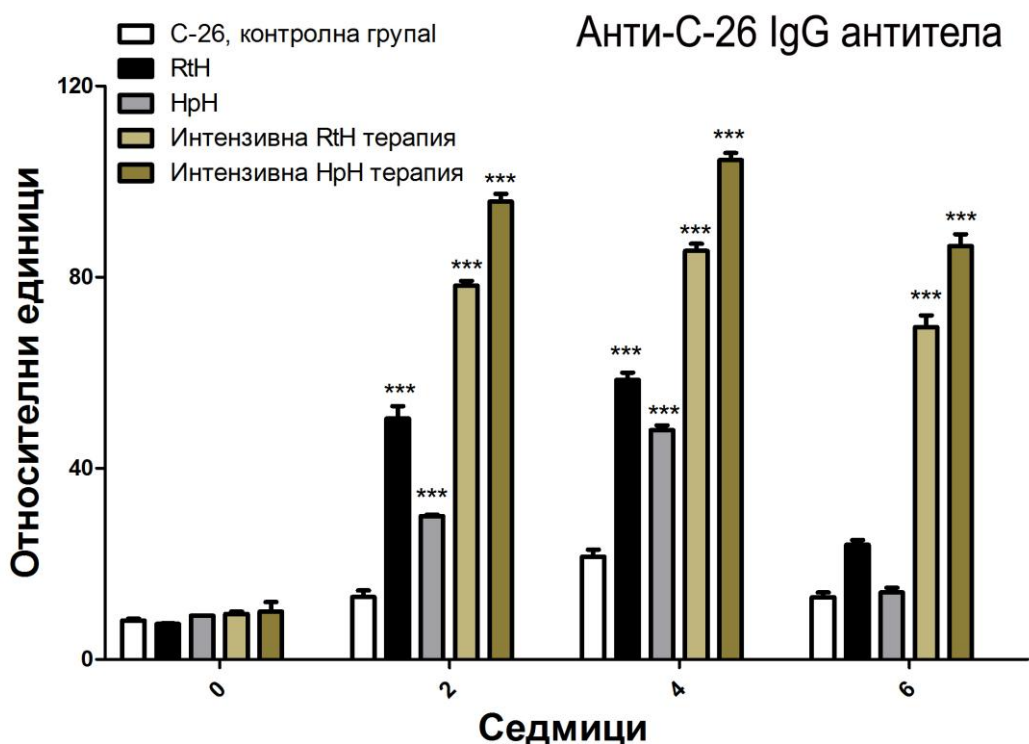
Фигура 19. Размери на слезките при различните експериментални животни. Слезките бяха изолирани 6 седмици след въвеждането на карциномните C-26 клетки. Подбрани са представителни за всяка експериментална група снимки.

✓ **Ефект от прилаганите терапии върху генерирането на анти-C-26 антитела**

Резултатите от тези анализи показват генериране на високи нива IgG антителата в двете групи с приложена интензивна терапия (интензивна RtH терапия и интензивна HpH терапия).

И двете групи показват статистически достоверно увеличаване в тези нива още на втората седмица след въвеждането на раковите клетки, като тези стойности запазват високите си нива до края на проследения период - 6 седмици след

въвеждането на C-26 клетките. Нивата на анти-C-26 антителата в групите третирани с не-интензивна терапия с двата хемоцианина също показват статистически достоверно повишаване през 2-рата и 4-тата седмица на проследения период, като те се понижават значително през 6-тата седмица, достигайки стойностите, характерни за контролната, нетретирани група (фигура 20).

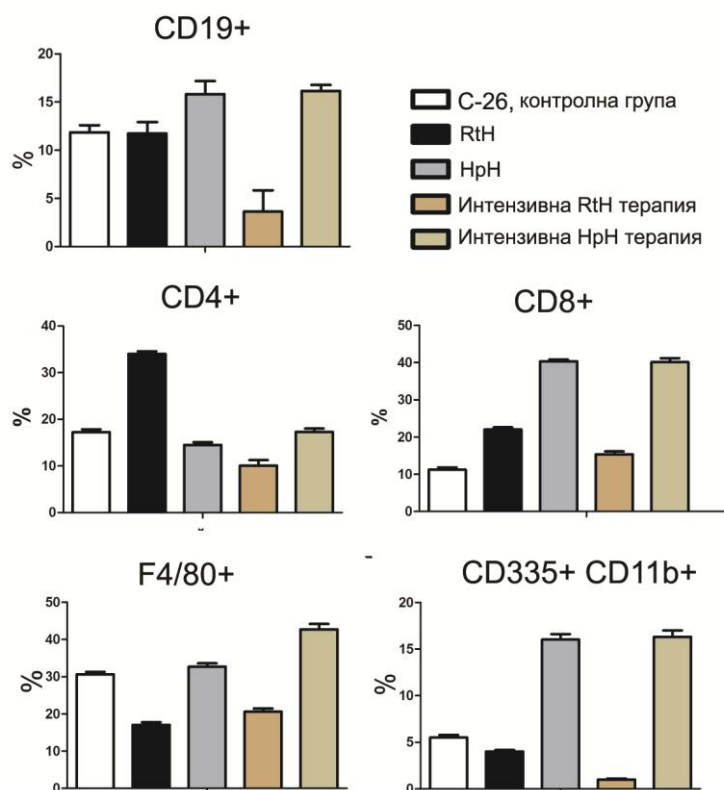


Фигура 20. Нива на анти-C-26 IgG антителата проследени в отделните експериментални групи мишки. Резултатите бяха получени от ELISA анализ. Стойностите за всяка група са представени като относителни единици. Student t test, (***) $p < 0.005$.

✓ **Ефект от проведените терапии върху популациите от имунни клетки в инфилтрати от солидни тумори.**

В хода на развитието на солидни тумори в тях се инфилтрират различни субпопулации от имунни клетки, като тяхното присъствие и съотношение оказват влияние върху прогреса на заболяването. Бяха проследени основни тумор-инфилтрирани лимфоцитни популации. Беше проследен процентът на популациите от CD4+, CD8+, CD19+, F4/80 и CD335+CD11b+. Всеки експеримент беше проведен между 3 и 5 пъти и резултатите са представени като средни стойности от проведените повторения. В групата третирани с по-малки количества RtH процента на CD19+ клетките беше близък до процента получен при нетретирани контролни мишки. CD4+ клетките в тези животни бяха близо два пъти повече в сравнение с

контролните. Броят на CD8+ клетките беше по-висок, докато този на F4/80+ клетки и CD335+CD11b+ клетки - по-нисък.



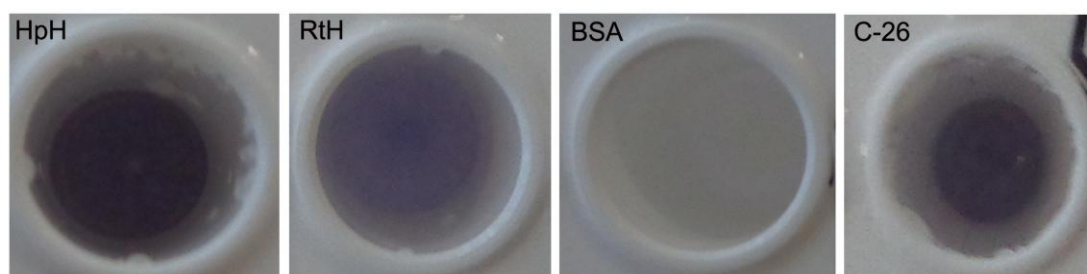
Фигура 21. Проточен цитометричен анализ за определяне на процентното съдържание на тумор-инфилтрирани лимфоцитни популации в солидни тумори. Солодни тумори от 3-5 животни от всяка експериментална група бяха изолирани и анализирани за количествено съдържание на CD4+, CD8+, CD19+, F4/80+ и CD335+CD11b+ клетъчните популации чрез проточна цитометрия.

При животните от групата с проведена интензивна RtH терапия резултатите са различни. При тази група беше наблюдаван значително по-нисък процент на CD19+ клетъчна популация, както и на CD335+CD11b+ популацията в сравнение с нетретирани животни. Освен това по-ниски процентни стойности от контролните мишки бяха отчетени и при CD4+ и F4/80+ клетки. Единствено при CD8+ клетъчната популация беше отчетено слабо повишаване. За разлика от мишките, инжектирани с RtH хемоцианина двете експериментални групи, третирани с HpH показват сходно поведение по отношение на инфилтрираните клетъчните популации. Както се вижда от фигура 21 и двете терапии водят до повишаване процентното съдържание на CD4+ клетките, значително увеличаване на CD8+ популацията и на CD335+CD11b+ популацията. Броят на CD4+ клетките и на F4/80+ клетките са близки до контролните нетретирани мишки, като при F4/80+

популацията при третираните животни с интензивна HpH терапия беше наблюдавано увеличение в процентното съдържание.

- **Доказване наличието на сиализираната форма на олигозахарида Lewis^x (SLe^x) по повърхността на RtH, HpH и C-26 карциномни клетки**

Олигозахарида SLe^x е типичен тумор-асоцииран въглехидратен антиген, характерен за рака на дебелото черво и други типове злокачествени заболявания. Високата му експресия се свързва с повишена възможност за метастазирание и корелира със степента на злокачественост на раковите клетки. Доказаната кръстосана реактивност с епитопи от двата хемоцианина и карциномните C-26 клетки бяха предпоставка за наличие на общ епитоп и този олигозахарид е един от възможните епитопи.



Фигура 22. Дот-блот анализ за присъствие на сиализираната форма на олигозахарида sLe^x върху изследваните хемоцианини и лизат от карциномни C-26 клетки. За отрицателна контрола е използван говежди серумен албумин (белтък без въглехидратна компонента в състава си). Пробите бяха инкубирани с анти-SLe^x антитяло и визуализирани по стандартна техника.

Резултатите от дот-блот анализа разкриха силно застъпено присъствие на SLe^x олигозахарида по повърхността на HpH хемоцианина и по-слабата му експресия по повърхността на RtH (фигура 22). Резултатите също потвърдиха експресията на този антиген и по повърхността на карциномните C-26 клетки, за сметка на пълната му липса при негативната контрола (BSA).

ДИСКУСИЯ

Предмет на настоящият дисертационен труд беше да анализира два хемоцианина – RtH, изолиран от морския охлюв *Rapana thomasiana* и HpH, изолиран от градинския охлюв *Helix pomatia*. Целта беше изследване на потенциала за използването им като биоадюванти в състава на неконюгирани анти-вирусни и

анти-бактериални ваксини и определяне на анти-тумрния им ефект *in vitro* върху ракови клетъчни линии и *in vivo* в миша моделна система на рак на дебелото черво.

Резултатите от проведените експерименти потвърдиха, че както RтН, така и НрН са силни имуномодулатори, които провокират имунен отговор срещу собствените си молекули и срещу моделни антигени при комбинираното им въвеждане. Инжектирани в Balb/С мишки като част от състава на анти-грипна или анти-бактериална ваксина двата изследвани хемоцианина от една страна индуцират продукцията на анти-вирусни или анти-бактериални антитела и от друга страна провокират образуването на дългоживущи цитотоксични Т лимфоцити, специфични по отношение на антигена. За хемоцианините е известно, че стимулират по-силно Th1 насочения имунен отговор. За това свидетелстват както повишените серумни нива на IFN γ и други провъзпалителни цитокини, така и преобладаващите IgG субкласове (IgG2a) синтезирани в отговор на инжектиране с хемоцианините (Tchorbanov et al, 2008; Szabo SJ et al, 2003). Въпреки това има данни и за развитието на смесен тип CD4⁺ Т лимфоцитен отговор, характеризиращ се с повишени нива както на IFN γ , така и на IL4 (Doyle AG et al, 1998; Tchorbanov et al, 2008).

Много анти-вирусни ваксини се прилагат в комбинация с адюванти - алуминиеви деривати (Lindblad EB et al, 1995). Известно е, че тази група адюванти предизвиква силен хуморален имунен отговор, но не успява да стимулира добре клетъчно-медиацията на имунитет (Schirmbeck R et al 1994; Traquina P et al, 1996; Brewer JM et al, 1996). Резултатите от нашите изследвания показваха, че и двата изследвани хемоцианина, въведени като адюванти към анти-вирусни ваксини провокират генерирането на специфичен клетъчен имунитет по отношение на вирусно-заразени клетки 6 месеца след началото на имунизирнето. Известно е също, че активирането на цитотоксичните Т лимфоцити не може да протече ефективно без въздействие от страна на NK клетките (Welsh RM, 1981). Активирането на Т лимфоцитите води до деактивиране на NK клетките, тъй като в конкуренцията за активиращи сигнали лимфоцитите притежават по-високо афинитетни рецептори от NK клетките. Генерирането на специфични цитотоксични Т лимфоцити след инжектиране с двата изследвани хемоцианина говори и за активиране на NK клетки, които инициират цитотоксичните процеси. Активирането на NK клетки е присъщо не само за RтН и НрН хемоцианините, но и за KLH, ССН (Molledo B, et al 2005; Sarker MR et al 2014). Генерирането на дългоживущи цитотоксични Т лимфоцити е важно преимущество за ефективността на анти-вирусните ваксини. Това дава основание да се смята, че RтН и НрН могат да се разглеждат като потенциални биоадюванти, използвани самостоятелно или допълващи действието на алуминиевите деривати по отношение на стимулиране на клетъчния имунен отговор.

Употребата на алуминиевите адюванти се свързва с множество странични реакции, които могат да възникнат след ваксинация като формиране на грануломи,

повишени серумни нива на IgE антителата и невротоксичност (Schirmbeck R et al, 1995; Traquina P et al 1996; Brewer JM et al 1996). Може би най-сериозният проблем при употребата на този тип адюванти е факта, че са трудно разградими, поради което могат да акумулират в организма, да причинят неврологичен синдром и дори да бъдат свързани с развитие на болест на Алцхаймер (Lindblad EB, 1995). За разлика от тях при хемоцианините няма литературни данни, които да съобщават за каквито и да било сериозни странични реакции (Roth DR et al, 2006; Voelens P et al, 2004). Хемоцианините са белтъчни молекули и като такива са биоразградими, не се натрупват в организма и не провокират странични реакции (Lamm DL et al, 2000; Olsson CA et al, 1974; Jurincic CD et al, 1988; Flamm J et al, 1990). Имайки предвид резултатите, демонстриращи потенциала на двата изследвани хемоцианина да стимулират продукцията на антитела срещу въведените с тях антигени, както и специфичен цитотоксичен отговор, RtH и HpH разкриват добре изразен биоадювантен потенциал. Прилагането на хемоцианини, комбинирани с алуминиевите адюванти в състава на различни ваксини би могло от една страна да намали използваните количества от алуминиевите соли в състава на ваксините и от друга страна би могло да увеличи ефективността на ваксините в индуцирането на по-добре проявен клетъчно-медиран имунен отговор. Всичко това дава основание за бъдещи изследвания за комбинирано прилагане на хемоцианин и субоптимални дози от алуминиеви деривати, като допълващи действието си адюванти в състава на различни типове ваксини.

Резултати от клинично проучване през 2000 година съобщават, че интравенозна терапия с KLH за 6 седмици при пациенти в различни стадии на рак на пикочния мехур се отразява благоприятно и няма никакви регистрирани странични реакции (Lamm DL et al, 2000). Анти-туморният потенциал на RtH и HpH хемоцианините също беше анализиран върху миши и човешки ракови клетъчни линии. Получените резултати не показаха пряк дозо-зависим ефект между процента на индуцираната апоптоза и количествата използван хемоцианин. Американският колектив, изследващ детайлно *in vitro* цитопатичните ефекти на KLH също показва, че дозо-зависим ефект не се наблюдава нито по отношение на предизвиканата апоптоза, нито по отношение на потискане на пролиферацията (Riggs DR et al 1992; McFadden DW et al, 2003; McFadden DW et al, 2007; Riggs DR et al, 2005; Rizvi I et a, 2007). Ефектът на RtH и HpH върху индуцираната апоптоза беше изразен най-силно след 72-часова инкубация. Тези резултати намериха потвърждение и при експериментите с KLH, където най-силно изразен ефект от действието му по отношение на предизвиканата апоптоза и потиснатата клетъчна пролиферация също е наблюдаван след 72-рия час от инкубирането (Riggs DR et al 1992; McFadden DW et al, 2003; McFadden DW et al, 2007; Riggs DR et al, 2005; Rizvi I et a, 2007).

В следващият етап беше определен анти-туморния ефект на двата изследвани хемоцианина *in vivo* в експериментална миша моделна система на рак

на дебелото черво. За целта беше избран класически модел, индуциран след инокулиране на Balb/C мишки с C-26 карциномни клетки (Corbett TH et al, 1975).

Значението на предварителното инжектиране с хемоцианини е изследвано от много автори (Recker F, and Rubben H, 1989; Swerdlow RD et al 1996; Arentsen HC et al, 2009; Linn JF et al, 2000; Becker MI et al, 2009; Moltedo et al, 2006). Някои от авторите са единодушни, че за постигане на силен анти-туморен ефект е необходимо предварително инжектиране с хемоцианините (Moltedo et al, 2006; Lamm DL et al, 2008; Lamm DL et al, 1993). Резултатите от нашите изследвания не потвърдиха по категоричен начин това твърдение, защото както сенсibiliзираните групи, така и групите без предварително инжектиране показаха подобрене по отношение на определени показатели.

В по-късен етап на експериментите беше анализирано и значението от прилагането на различни дози от изследваните хемоцианини. Съществуват множество литературни данни, описващи прилагане на разнообразни количества хемоцианини, инжектирани в рамките на различни имунизационни схеми, но за сега няма единодушно възприет подход (Jurincic CD et al, 1988; Olsson CA et al, 1974; Flamm J et al, 1990; Swerdlow RD et al 1996; Arentsen HC et al, 2009; Linn JF et al, 2000; Becker MI et al, 2009; Moltedo et al, 2006). В последната група експерименти бяха анализирани две различни терапии, засягащи интензитета на прилагане на RtH и HpH хемоцианините. В първата анализирахме неинтензивна терапия, включваща прилагане на ниски дози хемоцианини (100 мкг/мишка) интратуморно, един път седмично след инокулиране на туморните клетки. Другата схема на инжектиране се състоеше в интензивна седем дневна терапия (100 мкг/мишка) непосредствено след инокулацията на раковите клетки и допълваща терапия един път седмично (1 мг/мишка) за период от 3 седмици. Резултатите от тези експерименти показаха недвусмислено значението на интензивността на хемоцианиновата терапия по отношение на всички проследени параметри. При групата с проведена интензивна терапия беше наблюдавано по-бавно развитие и нарастване на солидните тумори, запазване на размерите на слезките, както и по-високи серумни нива на анти-C26 антителата в сравнение с нетретирани контролни животни и с групите с проведена неинтензивна терапия. Особено важен показател е нивото на серумните анти-C26 антитела. По отношение на този параметър интензивната терапия с HpH и RtH доведе до генерирането на силен хуморален отговор към раковите клетки, който запази високите си стойности до 6 седмици след въвеждането на C-26 клетките.

В тази група експерименти беше анализирано и съдържанието на туморните инфилтрати по отношение на основни клетъчни популации. В този експеримент определящо значение имаше не интензитета на проведената терапия, а вида на инжектирания хемоцианин. Тенденциите при двете групи, инжектирани с HpH (интензивна и не-интензивна терапия) показа процентно увеличаване на почти всички следени популации (CD8+, CD19+, F4/80+, CD335+CD11b+), с изключение

на CD4+ клетките, чиито нива останаха близки до тези на контролните, нетретирани животни. Обратно, при групите инжектирани с RтН нивата на проследените типове клетки бяха близки до тези на контролите или занижени, с изключение на по-високите нива на CD4+ клетките при мишките с неинтензивна RтН терапия. Туморните лимфоцитни микроинфилтрати са показателни за развитието, прогнозата и протичането на заболяването. Ролята на имунните клетки в тях е двустранна, като присъстват както клетки с ясно изразен анти-туморен профил (CD8+, NK), така и клетки с имunosупресорни качества (алтернативно активирани моноцити, регулаторни Т лимфоцити, неутрофили, Th2 CD4+ ефекторни клетки) (DeNardo DG et al, 2011; Ruffell B et al, 2011; Rolny C et al, 2011). Авторите, изследващи FLH хемоцианинът също съобщават за увеличаване в популациите на CD4+, CD8+, CD19 и NK1.1 клетките след хемоцианиновата терапия. Увеличените количества на CD4+ лимфоцитите не могат да бъдат едностранно отнесени към тумор-инфилтрираните лимфоцити (TILs) с анти-туморен профил. Въпреки ключовата роля на Th1 CD4+ лимфоцитите по отношение на секретирането на цитокини и активиращи фактори за цитотоксичните Т лимфоцити, CD4+ клетъчната популация включва и Th2 CD4+ ефекторни клетки, както и регулаторни Т лимфоцити (Tregs), които имат ясно изразен имunosупресивен характер. Тези клетки са отговорни за потискане на реакцията към автоантигени в нормални условия, поради което разполагат със силно изразен имunosупресорен капацитет и освен това могат да секретират разтворими фактори, които да стимулират по директен начин пролиферацията и мигрирането на малигнни клетки (Tan W et al, 2011). Подобно на CD4+ инфилтратите стои и въпросът с увеличените количества на F4/80+ популацията. Тази клетъчна популация включва както класически активирани макрофаги (Classically activated macrophages, CAMs), така и алтернативно активирани макрофаги (Alternatively activated macrophages, AAMs). CAMs се активират под въздействието на IFN γ , TNF α и GM-CSF и притежават повишена цитотоксична активност, секретират проинфламаторни (Th1) цитокини и демонстрират силно изразен потенциал за представяне на антигени (Mosser DM and Edwards JP, 2008). Обратно AAMs се активират в следствие повишени нива на IL4, IL13, имунни комплекси и имunosупресорни цитокини. Тези клетки не притежават цитотоксична активност, блокират действието на CD8+ клетките и секретират медиатори, които имат пролиферативно действие, способстват ангиогенезата и възстановяването на тъканите (Andreu P et al, 2010; DeNardo DG et al, 2009; Qian BZ and Pollard JW, 2010). Повишеното ниво на CD4+ и F4/80+ клетъчните популации единствено ни показва активиране и пролиферация в една от съставлящите ги субпопулации, но не ни дава информация за въздействието на тези клетки върху злокачественото заболяване. Все пак можем да отчетем като положителен резултат факта, че и при двете групи третирани с RтН (с интензивна и неинтензивна терапия) се наблюдава увеличение в броя на CD8+ лимфоцитите и на CD335+CD11b+ клетките, притежаващи анти-туморна активност. За да бъде детайлно проучен профилът на тумор-инфилтрираните лимфоцити след хемоцианинова терапия е необходим

флуоцитометричен анализ, показващ баланса между всички лимфоцити с анти-туморен профил и тези със супресорни характеристики. Така може да бъде изяснено участието на типовете клетки, активирани от използвания хемоцианин, а освен това може да се направи паралел при употребата на два хемоцианина.

Въглехидратните епитопи вероятно имат значение и за анти-туморния ефект, постигнат след инжекране с RtH и HpH. Резултатите, демонстриращи генерирането на анти-C26 антитела в групите, сенсibiliзирани с хемоцианините още преди въвеждането на раковите клетки загатват за наличието на общи, кръстосано-реактивни епитопи между хемоцианините и карциномните клетки, подобно на вече описаният Т-антиген експресирани върху KLH, FLH и ракови клетки от тумор на пикочния мехур. Освен това наскоро беше доказано, че в серумите на пациенти инжектирани с KLH се появяват антитела, разпознаващи различни тумор-асоциирани въглехидратни антигени, като Lewis^X, Lewis^Y, GM3 и сиализираната форма на Lewis^A (Oyelaran O and Gildersleeve JC, 2010). Високите стойности на анти-C-26 антителата в серумите на сенсibiliзираните с хемоцианини групи още преди въвеждането на C-26 клетките говорят за наличието на общи (кръстосано-реактивни) за хемоцианините и карциномните клетки антигенни епитопи. Резултатите от ELISA анализа със серуми на C-26 инокулирани мишки нетретирани с хемоцианини показват разпознаване между тези серуми и HpH и RtH и доказват наличието на такива кръстосано-реактивни епитопи.

Известно е, че много видове злокачествени заболявания се характеризират с променен профил на експресирани от раковите клетки олигозахаридни молекули (Smets LA and van Beek WP 1984; Nakamori S, 1995). Тези изменения най-често са свързани с по-висока експресия на определени въглехидратни остатъци или с появата на олигозахариди с променена структура (най-често промяната включва добавяне на молекули сиалова киселина). Сиализираната форма на олигозахарида Lewis^X (sLe^X; (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β 1-R) се експресира върху нормални човешки лимфоцити и е свързан с процесите на взаимодействие между лимфоцитите и E-селектините, експресирани от активирани ендотелни клетки при екстравазация на имунните клетки (Lowe JB et al, 1990; Phillips ML et al, 1990; Walz G et al, 1990). Този олигозахарид е широко експесиран и при много видове карциномни заболявания. Доказано е, че при колоректални карциноми високата експресия на олигозахарида Lewis^X корелира с по-висока степен на метастазиране и с неблагоприятни прогнози (Nakamori S et al, 1993; Ura H et al, 1997). Метастазирането на солидни тумори е комплексен процес, при който ракови клетки се отделят от мястото на първично възникване на тумора и навлизат в кръвната система, след което инвазират в различни тъкани и органи посредством взаимодействие с ендотелните E-селектини, преминават към нова локация и остановяват метастазно образуване (Saiki I, 1997). Този процес силно наподобява екстравазацията на лимфоцитите по отношение на механизмите на протичане.

Ключовото значение на sLe^X за процесите на инвазивност и метастазиране при карцином на дебелото черво, наличието на кръстосано-реактивни епитопи между изследваните хемоцианини и карциномните клетки и отчетените по-ниски стойности на формиране на метастазни образувания при сенсibiliзирани животни третирани с RtH или HpH, ни дадоха основание да проверим наличието на sLe^X кръстосано-реактивни епитопи по повърхността на двата хемоцианина. Резултатите от проведения дот-блот анализ потвърдиха това и подсказаха предполагаем механизъм, отговорен за анти-туморните качества на двата хемоцианина. По-силната експресия в HpH обяснява по-силния терапевтичен ефект на този хемоцианин в сравнение с RtH. Въглехидратната компонента на HpH е приблизително три пъти по-голяма от тази на RtH и очаквано количествено застъпване на sLe^X е по-значително там. Възможно е RtH и HpH хемоцианините, инжектирани в експерименталните животни да действат подобно на анти-туморните въглехидратни ваксини, при които за белтък носител се използва KLH. В случая RtH и HpH активират синтеза на антитела, специфични за sLe^X тумор-асоциирания въглехидратен антиген подобно на белтък-носител с конюгирания към него олигозахарид. В допълнение на това хемоцианините имат активиращ потенциал, който води до общо повишено ниво на имунната реакция. Това от своя страна подпомага имунните клетки за по-лесно разпознаване между „свое” и „чуждо” и води до елиминиране на чуждите трансформирани/ракови клетки. Освен общ имуностимулаторен потенциал вероятно двата изследвани хемоцианина имат и локално анти-туморно действие след интратуморната им въвеждане. Там те могат да повлияват и стимулират неспецифични имунни реакции на възпаление и да активират някои от клетките на вродения имунитет - макрофаги и гранулоцити. От друга страна хемоцианините имат потенциала да активират NK и цитотоксични Т лимфоцити, а след взаимодействие с дендритните клетки и представяне на кръстосано-реактивни тумор-асоциирани детерминанти биха могли да ангажират и адаптивния анти-туморен отговор. Досега хемоцианините бяха означавани като неспецифични имунни стимулатори, но все повече статии съобщават за специфичното им действие по отношение синтеза на антитела, разпознаващи конкретни туморни антигени. Хемоцианините варират във въглехидратния си профил както качествено, така и количествено, което загатва за многобройните възможности за други кръстосано-реактивни епитопи.

В заключение може да се обобщи, че двата изследвани хемоцианина RtH и HpH имат имуностимулаторен потенциал, поради което могат да бъдат използвани в качеството си на биоадюванти към неконюгирни ваксини самостоятелно или като допълващи действието на конвенционално-използвани адюванти, с цел намаляване на инжектираните количества адювант и ограничаване на страничните реакции. От друга страна RtH и HpH проявяват анти-туморен ефект при моделен рак на дебелото черво при мишки, като въпроса за анти-туморния им потенциал при други ракови заболявания остава отворен. Детайлното анализиране на въглехидратния профил на индивидуалните представители на хемоцианиновото

семейство би посочило по-ефективния хемоцианин за конкретния случай на злокачествено заболяване, което може да разшири тяхното приложение.

На базата на резултатите получени до момента става ясно, че благодарение на своята имуностимулаторна активност хемоцианините могат да се разглеждат като терапевтично средство с голям потенциал и без странични реакции.

ИЗВОДИ:

- 1. Доказано беше, че хемоцианините RtH и HpH са силни имуностимулатори, притежаващи активиращ потенциал, както по отношение на хуморалния, така и по отношение на клетъчно-зависимия имунен отговор.**
- 2. Демонстрирано беше, че RtH комбиниран с анти-вирусна ваксина е основен фактор за генериране на анти-вирусни IgG и IgM антитела и дългоживущи цитотоксични Т лимфоцити, специфични по отношение на вирус-заразени клетки.**
- 3. При използването на RtH хемоцианинът комбиниран с анти-бактериална ваксина се синтезират високи нива на анти-бактериални IgG антитела – беше наблюдаван синергичен, адитивен ефект, дължащ се на адювантното действие на RtH.**
- 4. Установена беше активираща роля на HpH хемоцианинът по отношение на генерирането на продължителен специфичен цитотоксичен имунен отговор в състава на анти-вирусни ваксини.**
- 5. Приложен в състава на анти-бактериална ваксина HpH стимулира пролиферативната активност на Б и Т лимфоцитите и допринася за генерирането на специфични антитяло-продуциращи плазматични клетки.**
- 6. За първи път беше доказано, че двата изследвани хемоцианина демонстрират про-апоптичен ефект върху клетки от миша ракова линия С-26.**
- 7. Демонстрирано беше, че сенсibiliзирането с двата хемоцианина при терапия на миши модел на рак на дебелото черво повишава ефективността на терапията по отношение на формирането на метастази в белите дробове на животните, потискането на спленомегалията и нивата на анти-С-26 антителата.**
- 8. Потвърдено беше, че интензитета на хемоцианиновата терапия също има значение за ефективността на повлияването. Интензивната терапия с двата хемоцианина доведе до подобряване на следните клинични показатели: инхибиране на нарастването на обема на туморите, потискане развитието на спленомеглия, подържане на високи нива анти-туморни антитела и повишаване на определени популации от тумор-инфилтрирани лимфоцити.**

9. За първи път беше установено, че RtH, HpH и C-26 клетките притежават общ епитоп, разпознаван от анти- sLe^x антитяло.

ПРИНОСИ:

1. Изследвани са основни имунологични характеристики на RtH и HpH хемоцианините. Доказани са имуногенните качества на HpH хемоцианина.
2. Анализирани и потвърдени са възможността за употребата на тези респираторни молекули като биоадюванти в състава на неконюгирани анти-бактериални и анти-вирусни ваксини.
3. Установен е анти-туморния ефект на двата хемоцианина както върху клетъчни култури, така и в миши модел на рак на дебелото черво. Демонстриран е ефекта от прилагането на различни терапевтични подходи (предварително сенсibiliзиране с хемоцианините и прилагане на различни по интензитет терапии) за ефективността на повлияване на заболяването.
4. Върху двата изследвани хемоцианина е доказано наличието на кръстосано реактивен епитоп с ключовия тумор-асоцииран въглехидратен антиген sLe^x.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА:

1. **Gesheva V.**, Idakieva K., Kerekov N., Nikolova K., Mihaylova N., Doumanova L., Tchorbanov A. Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. *Fish and Shellfish Immunol* 2011, 30 (1), 135-142. IF 3.322
2. **Gesheva V.**, Idakieva K., Kerekov N., Nikolova K., Mihaylova N., Doumanova L., Tchorbanov A. Rapana thomasiana hemocyanin as adjuvant for conventional vaccines *Advances in Bulgarian Sciences*, 2010, 2011, 21-29, ISSN: 1313-2563.
3. Idakieva K., **Gesheva V.**, Mihaylova N., Doumanova L., Tchorbanov A. Rapana thomasiana hemocyanin as a protein carrier and adjuvant of bacterial and viral vaccines. In: *Gastropods: Diversity, Habitat and Genetics*. Bianchi A, Fields J. (Editors). Nova Science Publishers, Inc 2011, ISBN: 978-1-61324-695-5.
4. **Gesheva V.**, Chausheva S, Mihaylova N, Manoylov I, Doumanova L, Idakieva K and Tchorbanov A. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma, *BMC Immunology* 2014, 15:34, <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/15/34>. doi:10.1186/s12865-014-0034-3 IF 2.25
5. **Gesheva V.**, Chausheva S, Stefanova N, Mihaylova N, Doumanova L, Idakieva K, Tchorbanov A. *Helix pomatia* hemocyanin - a novel bioadjuvant for viral and bacterial antigens. *Submitted*

УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ И КОНГРЕСИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА:

1. Second European Congress of Immunology, September 13-16, 2009, Berlin, Germany. European Journal of Immunology, Supplement 1/09.

Rapana thomasiana hemocyanin as protein-carrier and bio-adjuvant of bacterial and viral proteins. **Gesheva V.**, Nikolova K., Mihaylova N., Idakieva K., Doumanova L., Tchorbanov A.

2. Innovative strategies for vaccines: malaria, tuberculosis, HIV. November 4 – 6, 2010, Sorrento, Italy. **EFIS стипендия**

Rapana thomasiana hemocyanin as adjuvant of non-conjugated bacterial and viral proteins. **Gesheva V.**, Nikolova K., Mihaylova N., Idakieva K., Doumanova L., Tchorbanov A.

3. 3rd European Congress of Immunology ECI 2012, September 5 – 8, 2012, Glasgow, Scotland, UK

Bioadjuvant and Anti-cancer Properties of Hemocyanins in Experimental Models in vitro and in vivo. **Gesheva V.**, Mihaylova N., Idakieva K., Tchorbanov A.

4. 5th EFIS-EJI South East European Immunology School (SEEIS2013), September 20-23, Sofia, Bulgaria. **EFIS стипендия**

Helix pomatia Hc (HpH) hemocyanin as protein-carrier and bio-adjuvant of bacterial and viral proteins. Nadia Stefanova, Stela Chausheva, Vera Gesheva, Nikolina Mihaylova, Krassimira Idakieva, Lyuba Doumanova, Andrey Tchorbnov.

5. 8th Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanika, 2013, 02-05.10.Veliko Turnovo, Bulgaria

Hemocyanins s adjuvants for non-conjugated bacterial and viral proteins. **Gesheva V**, Idakieva K, Chausheva S, Kerekov, N, Mihaylova N, Doumanova L, Tchorbanov A.

6. Осма работна среща на тема "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти", Институт по Експериментална Морфология и Антропология с Музей, БАН, 2013, София, България

Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins on murine model of colon adenocarcinoma **Gesheva V**, Chausheva S, Mihaylova N, Manoylov I, Doumanova L, Idakieva K and Tchorbanov A

7. Осма работна среща на тема "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти", Институт по Експериментална Морфология и Антропология с Музей, БАН, 2013, София, България

Helix pomatia Hc (HpH) hemocyanin as protein-carrier and bio-adjuvant of bacterial and viral proteins. Nadia Stefanova, Stela Chausheva, Vera Gesheva, Nikolina Mihaylova, Krassimira Idakieva, Lyuba Doumanova, Andrey Tchorbnov

8. 11th EFIS-EJI Tatra Immunology Conference 2014, September. 6-10, **EFIS стипендия**

Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murin model of colon. **Gesheva V**, Chausheva S, Mihaylova N, Manoylov I, Doumanova L, Idakieva K, Tchorbanov A.

9. VI National Congress of Immunology 2-5 October, Varna, 2014;
Modulation of the immune response by Gastropodan hemocyanins in metastasis model of glioblastoma; Iliyan Manoylov, **Vera Gesheva**, Silviya Bradyanova, Krassimira Idakieva, Lubka Doumanova, Andrey Tchorbanov

10. VI SEEIS, Romania, September 26-29, 2014;
Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins on murine model of colon adenocarcinoma; Slav Slavov, **Vera Gesheva**, Krassimira Idakieva, Lubka Doumanova, Andrey Tchorbanov

ЦИТАТИ:

Gesheva V., Idakieva K., Kerekov N., Nikolova K., Mihaylova N., Doumanova L., Tchorbanov A. Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. *Fish and Shellfish Immunol* 2011, 30 (1), 135-142.

1. Harris JR, Soliakov A, Lewis RJ, Depoix F, Watkinson A, Lakey JH. Alhydrogel(®) adjuvant, ultrasonic dispersion and protein binding: A TEM and analytical study. *Micron*, 2012, 43(2-3):192-200

2. Pohanka, M. HI-6 modulates immunization efficacy in a BALB/c mouse model. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013, 36 (3), 801-806.

3. Becker, M., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M. and De Ioannes, A. Immune Response Activation: Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications. <http://dx.doi.org/10.5772/57552>; pp 45-72

