

ИМЕ НА ПРОЕКТА: Изследване на биофлавоноида фустин за антитуморно, противовъзпалително и гастро-ентеро-хепатопротективно действие в експериментални фармакологични модели	
ФИНАНСИРАЩА ОРГАНИЗАЦИЯ:	Фонд „Научни изследвания“
ТИП НА КОНКУРСА И ГОДИНА:	Конкурса за финансиране на фундаментални научни изследвания 2020 год.
НОМЕР НА ПРОЕКТА:	КП-06-Н43/6 от 30.11.2020 год.
РЪКОВОДИТЕЛ НА ПРОЕКТА:	проф. д-р Стефка Василева Вълчева – Кузманова, дмн
ПЕРИОД НА ПРОЕКТА:	2020 – 2023

Кратко резюме на проекта: Основна цел на проекта е да се изследва фармакологичната активност на биофлавоноида фустин в експериментални модели с човешки туморни клетъчни линии и опитни животни. За постигането на изследователската цел се предвижда изпълнението на следните основни групи задачи: (1) Изолиране и пречистване на фустин от дървесина на смрадлика чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) и ЯМР-спектроскопия; (2) Извършване на *in vitro* експерименти за комплексна оценка на цитотоксичния и цитостатичния потенциал на фустина върху панел от човешки клетъчни линии от: рак на млечната жлеза (MCF7, MDA-MB-231), рак на дебелото черво (Colon 26), злокачествен меланом на кожата (A375), сквамозно-клетъчен карцином на кожата (A431), нетуморогенна клетъчна линия от гръден епител (MCF10A) и нормална дермална клетъчна линия (BJ); изследване на способността на фустина да повлиява механизмите на апоптоза, процесите на миграция и адхезия, и блокирането на клетъчния цикъл в раковата клетъчна линия, показала най-висока чувствителност спрямо него; (3) Провеждане на серия от *in vivo* експериментални проучвания с опитни животни (плъхове) за оценка на противовъзпалителното и органопротективно действие на фустин в модели на: карагенан-индуцирано остро възпаление на лапата, индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза, тринитробензен сулфонат-индуциран колит и парацетамол-индуцирана хепатотоксичност чрез биохимични анализи на кръвен серум и органни хомогенати, хистопатологична оценка и имунохистохимични тестове. Предвижда се получените резултати да бъдат представени на научни форуми в страната (поне 12 участия) и чужбина (поне 12 участия) и да бъдат публикувани в научни списания с импакт фактор или импакт ранг (поне 5 приети или изпратени за печат научни публикации).

Работни пакети (РП):

РП 1 Изолиране и пречистване на фустин

РП 2 Оценка на антитуморния потенциал на фустин върху панел от клетъчни линии

РП 3 Оценка на противовъзпалителното и органопротективно действие на фустин при експериментални животни

РП 4 Широко разпространение и популяризиране на резултатите от проекта

РП 5 Управление на проекта

Благодарности:



Този проект е финансиран от Фонд “Научни изследвания” с договор № № КП-06-Н43/6 от 30.11.2020 год.

Съобщения във връзка с изпълнението на проекта

На 30 май 2022 год. приключи първият етап на проект „Изследване на биофлавоноида фустин за антитуморно, противовъзпалително и гастро-ентеро-хепатопротективно действие в експериментални фармакологични модели“

Изучаването на лечебните растения и на техни биологичноактивни компоненти, и идентифицирането на нови молекулни таргети е от актуално значение за развитието на лекарствената терапия. Такива фундаментални научни изследвания могат да послужат като база за разработването на нови лечебни средства и функционални храни и са подчертано значими при решаването на обществени предизвикателства, касаещи здравето, в т.ч. онкологичните заболявания.

Популярното в България лечебно растение смрадлика (*Cotinus coggygria*) има високо съдържание на полифеноли, от които дихидрофлавонолът фустин е почти непроучен в предклинични изследвания. Има сравнително добре документирана биологична активност за тотални екстракти от листа и дървесина на смрадлика и изолираните от тях главни фитохимични компоненти, с изключение за фустина. Това определи целта на проекта: да се изследва фармакологичната активност на фустин в експериментални модели с човешки туморни клетъчни линии и опитни животни. Тематиката на проекта попада изцяло в приоритетното научно направление „Храни и хранене“ на МУ – Варна за периода 2021 – 2025 г.

През първия етап на проекта са реализирани следните групи задачи: (1) Изолиран и пречистен е фустин от дървесина на смрадлика чрез високоефективна течна хроматография (HPLC) и ЯМР-спектроскопия; (2) Направена е комплексна оценка на *in vitro* цитотоксичния и цитостатичен потенциал на изолирания и пречистен фустин върху панел от клетъчни линии от рак на млечната жлеза (MCF7, MDA-MB-231), рак на дебелото черво (Colon 26), злокачествен меланом на кожата (A375), сквамозно-клетъчен карцином на кожата (A431), нетуморогенна клетъчна линия от гръден епител (MCF10A) и нормална дермална клетъчна линия (BJ). Изследвани са някои механизми на антитуморното действие в раковата клетъчна линия, показала най-висока чувствителност спрямо фустин, като индуциране на програмирана смърт на клетката, блокиране на клетъчния цикъл, модулиране процесите на миграция, адхезия и др. (3) Проведени са *in vivo* експериментални проучвания с опитни животни (плъхове) за оценка на противовъзпалителното и органопротективно действие на изолирания и пречистен фустин в модели на карагенан-индуцирано остро възпаление на задна лапа и индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза чрез биохимични анализи на кръвен серум и стомашни хомогенати, хистопатологична оценка и имунохистохимични тестове.

Резултатите показват, че фустинът проявява *in vitro* цитостатичен потенциал спрямо всички изследвани ракови клетъчни линии. Най-значителен антипролиферативен ефект е регистриран за клетъчна линия от рак на млечната жлеза MDA-MB-231. Установено е, че фустинът редуцира съществено броя на адхерентните живи MDA-MB-231 клетки и потиска способността им за образуване на колонии. Отчетена е селективност в действието на флавоноида спрямо нормалните клетъчни линии. При проучванията с опитни животни в модела на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза е установено, че фустинът намалява броя и площта на язвите и редуцира промените в стомашната лигавица вследствие прилагането на индометацин. При третиранията с фустин плъхове в този модел е отчетена и намалена експресия на редокс-сензитивния транскрипционен фактор NF- κ B – нуклеарен фактор, контролиращ възпалението и апоптозата. В модела на карагенан-индуцирано остро възпаление на задната лапа фустинът намалява отока, което демонстрира *in vivo* противовъзпалителния му ефект.

Вторият етап на проекта продължава с комплексната оценка на някои механизми и таргети на антитуморното действие на фустина в клетъчна линия от рак на млечната жлеза MDA-MB-231, както и с оценката на противовъзпалителното и органопротективно действие на фустина в модели на: тринитробензен сулфонат-индуциран колит и парацетамол-индуцирана хепатотоксичност. Получените резултати ще бъдат представени на научни форуми в страната и чужбина и ще бъдат публикувани в научни списания с импакт фактор или импакт ранг.

Научноизследователският проект „Изследване на биофлавоноида фустин за антитуморно, противовъзпалително и гастро-ентеро-хепатопротективно действие в експериментални фармакологични модели“ под ръководството на проф. д-р Стефка Василева Вълчева – Кузманова, дмн е финансиран на стойност 120 000 лв по Договор № КП-06-Н43/6 от 30.11.2020 год. с Фонд „Научни изследвания“ в Конкурса за финансиране на фундаментални научни изследвания 2020 год. В реализацията на проекта участват учени, постдокторанти и докторанти от научната група „Гастро-ентеро-хепатопротекция и терапия“ в Направление „Хранене и качество на живот“ на Научноизследователски институт към МУ – Варна, в колаборация с учени от Химическия факултет на Университета в Белград, Института по физиология на растенията и генетика към БАН, и Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.

На 12 юни 2024 год. приключи заключителният втори етап от изпълнението на проект „Изследване на биофлавоноида фустин за антитуморно, противовъзпалително и гастро-ентеро-хепатопротективно действие в експериментални фармакологични модели“ по Фонд „Научни изследвания“

Изучаването на лечебните растения и на техни биологичноактивни компоненти, и идентифицирането на нови молекулни таргети е от актуално значение за развитието на лекарствената терапия. Такива фундаментални научни изследвания могат да послужат като база за разработването на нови лечебни средства и функционални храни, и са подчертано значими при решаването на обществени предизвикателства, касаещи здравето, в т.ч. онкологичните заболявания. Популярното в България лечебно растение смрадлика (*Cotinus coggygria*) има високо съдържание на полифеноли, от които фустин е почти непроучен в предклинични изследвания. Има сравнително добре документирана биологична активност за тотални екстракти от листа и дървесина на смрадлика и изолираните от тях главни фитохимични компоненти, с изключение за фустина. Това определи целта на проекта: да се изследва фармакологичната активност на фустин в експериментални модели с човешки туморни клетъчни линии и опитни животни. Тематиката на проекта попада изцяло в приоритетното научно направление „Храни и хранене“ на МУ – Варна за периода 2021 – 2025 г.

През двата етапа на проекта са реализирани следните групи задачи:

(1) Изолиран и пречистен с чистота над 98% е 1 г фустин от 1 кг дървесина на смрадлика чрез фракционирание с колонна хроматография със силикагел, мониторирана с тънкослойна хроматография на алуминиеви плочи, обратно-фазова полупрепаративна високоефективна течна хроматография (RP-HPLC) и спектроскопия на ядрено-магнитен резонанс (ЯМР).

(2) Направена е комплексна оценка на *in vitro* цитотоксичния и цитостатичен потенциал на изолирания и пречистен фустин върху панел от клетъчни линии от рак на млечната жлеза (MCF7, MDA-MB-231), рак на дебелото черво (Colon 26), злокачествен меланом на кожата (A375), сквамозно-клетъчен карцином на кожата (A431), нетуморогенна клетъчна линия от гръден епител (MCF10A) и нормална дермална клетъчна линия (BJ). Получените резултати показват, че фустинът проявява *in vitro* цитостатичен потенциал спрямо всички изследвани ракови клетъчни линии. Отчетена е селективност в действието на биофлавоноида спрямо нормалните клетъчни линии. Най-значителен антипролиферативен ефект е регистриран за клетъчната линия от рак на млечната жлеза MDA-MB-231. Фустинът потиска способността на раковите клетки да мигрират и да образуват колонии. При флуоресцентните микроскопски анализи е установено, че фустинът редуцира съществено броя на адхерентните живи MDA-MB-231 клетки и индуцира апоптоза и некроза. Изследвани са някои молекулни механизми на антитуморното действие в човешката клетъчна линия от тройно-негативен рак на млечната жлеза, показала най-висока чувствителност спрямо

фустин, като индуциране на програмирана смърт на клетката, блокиране на клетъчния цикъл, модулиране процесите на миграция, адхезия и др. Установено е, че фустинът повлиява генната експресия на 7 гена, индуциращи апоптоза и блокиране на клетъчния цикъл, като биоинформатичният анализ показва, че те са свързани най-вероятно с CDKN1A-ATM взаимодействие и потискане на транскрипцията на MYC. Генът CDKN1A кодира протеина p21, който представлява инхибитор на циклин-зависимите кинази. Протеинът p21 е основна прицелна молекула на активността на p53 и по този начин е асоцииран с връзката между увреждането на ДНК и задържане на клетъчния цикъл. Белтъкът p21 се свързва и инхибира активността на комплексите циклин-CDK2, -CDK1 и -CDK4/6, като по този начин изпълнява функцията на регулатор на прогресията на клетъчния цикъл в G1 и S фазата. Прото-онкогена MYC взима участие в патогенезата на повечето видове онкологични заболявания при човека и неговото активиране е свързано с осъществяване на автономна пролиферация и растеж, неограничена репликация на ДНК, повишена белтъчна биогенеза, изменения в клетъчния метаболизъм, индуциране на ангиогенезата и др. Експресионните нива на гена са тясно свързани с клетъчната пролиферация – повишаване на експресията му при клетки в покой е достатъчно събитие, за да се опосредства навлизане в клетъчен цикъл, докато инхибиране на експресията на MYC води до преустановяване на клетъчното делене. Проведеният от нас qRT-PCR анализ установи съществено редуциране в нивата на транскриптите при прилагане на фустин в концентрации 35, 55 и 75 µg/ml.

(3) Проведени са *in vivo* експериментални проучвания с опитни животни (плъхове) за оценка на противовъзпалителното и органопротективно действие на изолирания и пречистен фустин в модели на карагенан-индуцирано остро възпаление на задна лапа, индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза, тринитробензен сулфонат-индуциран (ТНБС) колит и парацетамол-индуцирана хепатотоксичност чрез биохимични анализи на кръвен серум и органни хомогенати, хистопатологична оценка и имунохистохимични тестове.

При проучванията с опитни животни в модела на индометацин-индуцирана стомашна улцерогенеза е установено, че фустинът намалява броя и площта на язвите и редуцира промените в стомашната лигавица вследствие прилагането на индометацин. При третираните с фустин плъхове в този модел е отчетена и намалена експресия на редокс-сензитивния транскрипционен фактор NF-κB – нуклеарен фактор, контролиращ възпалението и апоптозата. В модела на карагенан-индуцирано остро възпаление на задната лапа фустинът намалява отока в първата фаза на остро възпаление, което демонстрира *in vivo* противовъзпалителния му ефект, подобен на този на нестероидните противовъзпалителни лекарства. Фустинът намалява статистически значимо голяма част от макроскопските и хистопатологичните параметри на тежък ТНБС-индуциран колит. В групата ТНБС се наблюдават дифузни зони с разязвяване, изразен и дифузен възпалителен инфилтрат във всички слоеве на стената, както и огнищен оток на дебелочревната лигавица. Фустинът значимо намалява отока и некротичните лезии. Демонстрираният органопротективен ефект на фустин в този модел е най-отчетлив при имунохистохимичния анализ на проби от дебелото черво на плъхове, третирани с доза от 20 mg/kg, за които

регистрирано и статистически значимо намаление в експресията на провъзпалителния транскрипционен фактор NF-κB. Фустинът демонстрира *in vivo* хепатопротективен ефект в модел на чернодробен оксидативен стрес, който е установен чрез хистопатологична оценка, биохимични анализи и имунохистохимични тестове. Той намалява значимо балонната дегенерация, възпалението и некрозата, причинени от парацетамол, както и плазмените нива на аланинаминотрансферазата, като основен биохимичен маркер за чернодробна увреда. Най-вероятно този органопротективен ефект се дължи отново на противовъзпалителните му свойства, защото той намалява значимо експресията на NF-κB. Установена е значимо увеличение в маркера за оксидативен стрес малонов диалдехид (MDA) при плъховете, третирани с парацетамол, но при тези, претретирани с фустин, оксидативният стрес се повишава без статистическа значимост, както в сравнение с контролната група, така и с тази, третирана с парацетамол. Така е изключено горепосочените *in vivo* органопротективни ефекти да се дължат на антиоксидантни свойства на фустина.

Получените по проекта резултати са представени чрез 32 научни съобщения на 15 научни форума в страната и чужбина, и са публикувани в 6 научни публикации в списания с импакт фактор или импакт ранг.

Научноизследователският проект „Изследване на биофлавоноида фустин за антитуморно, противовъзпалително и гастро-ентеро-хепатопротективно действие в експериментални фармакологични модели“ под ръководството на проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, дмн е финансиран на стойност 120 000 лв по Договор № КП-06-Н43/6 от 30.11.2020 год. с Фонд „Научни изследвания“ в Конкурса за финансиране на фундаментални научни изследвания 2020 год. В реализацията на проекта участват учени, постдокторанти и докторанти от научната група „Гастро-ентеро-хепатопротекция и терапия“ в Направление „Хранене и качество на живот“ на Научноизследователски институт към МУ – Варна, в колаборация с учени от Химическия факултет на Университета в Белград, Института по физиология на растенията и генетика към БАН и Института по биофизика и биомедицинско инженерство към БАН.