



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

маг. фарм. Деян Йорданов Йосифов

Сравнително *in vitro* изследване
на нови възможности за
фармакологично повлияване на
мултипления миелом

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователната и научна
степен „ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”

Професионално направление: „Фармация” (шифър 7.3)

Научна специалност: „Фармакология (вкл. фармакокинетика и
химиотерапия)”

Научен ръководител: Доц. Спиро М. Константинов, дм

Научен консултант: Проф. Мартин Р. Бергер, дм

Научно жури:

Проф. Маргарита Х. Караиванова, дмн

Проф. Митка К. Мичева, дм

Доц. Спиро М. Константинов, дм

Доц. Маргарита Л. Генова, дм

Доц. Георги Н. Балаценко, дм

София, 2011

Дисертационният труд е написан на 307 страници и включва 103 оригинални фигури и 8 таблици. Използвани са 274 литературни източника. Във връзка с дисертационния труд са публикувани две оригинални научни статии в чужди списания с импакт-фактор и една обзорна статия в българско списание без импакт-фактор.

Изследванията са проведени в Лабораторията по експериментална химиотерапия и молекулярна фармакология към Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология (Фармацевтичен факултет, МУ – София) и в Лаборатория по токсикология и химиотерапия (G401) към Германския център за онкологични изследвания в Хайделберг, Германия. Финансирането е съответно по програма „Развитие на научния потенциал във висшите училища” на Фонд „Научни изследвания” към Министерството на образованието, младежта и науката (договор № У-Б-401/06) и чрез стипендия от Германската служба за академичен обмен (DAAD).

Дисертационният труд е разгледан и одобрен от катедрен съвет на Катедрата по фармакология, фармакотерапия и токсикология към Фармацевтичния факултет на Медицински университет – София.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 29.07.2011 г. от 14:00 часа, в I аудитория на Фармацевтичния факултет на МУ – София (гр. София, ул. Дунав №2). Материалите по защитата са на разположение в сградата на Фармацевтичния факултет, ет. 1, кабинет 125.

ВЪВЕДЕНИЕ

Мултиплиеният миелом (ММ) е сравнително често хематологично злокачествено заболяване. Характеризира се със злокачествено разрастване в костния мозък на клон от трансформирани плазматични клетки, секретирани моноклонален имуноглобулин (парапротеин). Малигнените плазмоцити (МП) участват в множество взаимодействия с костно-мозъчната микросреда. На молекулно ниво тези взаимодействия се реализират чрез различни адхезионни молекули и цитокини, между които като особено важни могат да се изброят интерлевкин-6 (IL-6), инсулиноподобният растежен фактор 1 (IGF-1), съдово-ендетелният растежен фактор (VEGF), произвежданият от стромните клетки растежен фактор 1 (SDF-1) и макрофагеалните възпалителни протеини MIP-1 α и MIP-1 β . Тези взаимодействия активират сигналните пътища PI-3K/Akt/mTOR/p70S6K, IKK- α /NF- κ B, Ras/Raf/MAPK и JAK/STAT3, като крайният резултат е стимулиране на пролиферацията на МП и индуциране на лекарствена резистентност. Взаимодействието между миеломните клетки и костно-мозъчната микросреда се отразява и на костната структура – настъпва разрушаване на костната тъкан (остеолитични костни промени) чрез нарушаване на баланса между генерирането на остеоласти и активирането на остеокластите. Други често срещани усложнения при ММ са бъбречна недостатъчност, анемия и имунна недостатъчност. Липсата на възможност за пълно излекуване и настъпващата тежка инвалидизация на болните в терминалните стадии определят голямата социална значимост на заболяването. Страничните ефекти от основния терапевтичен подход, химиотерапията, допълнително утежняват положението на пациентите.

Напредъкът в познанието за биологията на ММ позволи „прицелването“ на нови лекарства в структури и процеси от ключово значение за развитие на заболяването. Новите терапевтични подходи, използвани самостоятелно или в комбинация помежду си и с конвенционални методи, дават възможности за преодоляване на резистентността и подобряване на клиничните резултати. Независимо от приблизително удвоената средна обща преживяемост на пациентите, ММ остава неизлечимо заболяване. Освен това новите лекарства имат характерни сериозни нежелани ефекти, като невротоксичност (характерна за Thalidomide и Bortezomib) и миелотоксичност (характерна за Lenalidomide и Bortezomib). Всичко това налага продължаване на усилията за откриване и разработване на нови вещества с потенциално по-голяма антимиеломна активност и по-ниска токсичност.

Алкилфосфохолините (АФХ) са синтетични вещества с противотуморно действие, които имат структурно сходство с алкиллизофосфолипидите, но за разлика от тях не съдържат глицеролов скелет в молекулата си. АФХ проявяват значителна цитотоксична и проапоптотична активност спрямо клетъчни линии от различни хематологични неоплазии, а освен това потенцират действието на множество конвенционални цитостатици. За разлика от конвенционалните цитостатици, АФХ не взаимодействат с ДНК, а проявяват афинитет към клетъчните мембрани, където се натрупват. АФХ инхибират синтеза на фосфатидилхолин и повлияват активността на сигналните пътища Ras/Raf/MEK/ERK и PI3K/Akt. В някои видове клетки, АФХ предизвикват сливане на мембранните липидни рафтове, включване в тях на „рецептори на смъртта“ (Fas/CD95 и TRAIL-R1/R2) и активиране на външния апоптотичен път. Друг характерен ефект е активиране на киназата JNK. Много интересен е фактът, че за разлика от класическите цитостатици, алкилфосфохолините не са миелоток-

сични и дори стимулират костно-мозъчната хемопоеза. Perifosine е представител на АФХ с циклична полярна глава, с който са проведени *in vitro* и *in vivo* изследвания при ММ и са получени обещаващи резултати. Перифозинът има характеристиките за първа генерация АФХ недостатъци като изразена холиномиметична активност, обуславяща ниска поносимост от страна на стомашно-чревния тракт, и хемолитични свойства, възпрепятстващи парентералното му приложение. Erufosine е представител на АФХ с ненаситена въглеводородна верига и модифицирана полярна глава и не страда от споменатите недостатъци на перифозина. Еруфозинът никога досега не е бил проучван при ММ, което ни подтиква да проведем изследвания в тази насока.

Куркуминът (диферулоилметан) е природно полифенолно съединение, на което се дължи жълтият цвят на подправката куркума, използвана от хилядолетия в индийската народна медицина. Множество изследвания показват, че куркуминът има значителна противотуморна и в частност противомиеломна активност и откриват перспектива за бъдещото му приложение като лекарствен продукт. Куркуминът има сложен и многостранен механизъм на действие. Той може да взаимодейства пряко с много мишени в клетката, които от своя страна повлияват различни сигнални пътища. Сред по-важните механизми са: инхибиране на киназния комплекс ИКК, отговарящ за активирането на транскрипционния фактор NF-κB; потискане на функциите на други транскрипционни фактори, като STAT, AP-1 и β-катенин; потискане на експресията на антиапоптотични протеини и провъзпалителни цитокини; инхибиране на някои кинази; анти/прооксидантно действие; инхибиране на протеазомата; индуциране на апоптотична или автофагична клетъчна смърт. Големи предимства на куркумина са изключително ниската му токсичност за нормалните клетки и участието му в синергистични лекарствени взаимодействия с цитостатици от различни групи. Представлява интерес установените комбинации със синергистичен антимиеломен ефект да се изследват при по-широк кръг от миеломни клетъчни линии, както и да се проучат ефектите при комбиниране на куркумин с перспективни нови противомиеломни лекарства. Важно е да се проучи и до каква степен антимиеломната активност на куркумина би могла да се повлияе негативно от разтворими фактори, секретирани в костно-мозъчната микросреда.

Диарсеновият триоксид е високоефективно средство за лечение на остра промиелоцитна левкемия (ОПЛ). Той стимулира разграждането на фузионния протеин PML-RARα, характерен за това заболяване, и в зависимост от концентрацията си оказва диференциращ или проапоптотичен ефект. As₂O₃ оказва по-умерен цитотоксичен ефект върху туморни клетки, произхождащи от други хематологични неоплазии, вкл. ММ. Сред механизмите му на действие се включват: индуциране на оксидативен стрес; активиране на сигналните пътища на митоген-активираните протеинкинази; инхибиране на някои тирозинкинази и киназния комплекс ИКК; индуциране на апоптоза. Следва да се проучат ефектите от комбинирано приложение на As₂O₃ с перспективни нови противомиеломни лекарства. Интересно е да се проучи и до каква степен противомиеломната активност на As₂O₃ би могла да се повлияе негативно от разтворими фактори, секретирани в костно-мозъчната микросреда.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Цел на дисертационния труд е да се проучат нови възможности за фармакологично повлияване на мултиплиения миелом, включващи както самостоятелно използване на перспективни вещества като Erufosine, куркумин и As₂O₃, така и комбинираното им приложение с утвърдени в клиничната практика лекарства като Melphalan, Bendamustine и Bortezomib.

Задачи

1. Да се определи цитотоксичният ефект на Erufosine върху миеломни клетъчни линии и миеломни клетки, изолирани от пациенти, и да се сравни с цитотоксичните ефекти на куркумин, As₂O₃, Melphalan, Bendamustine и Bortezomib върху същите клетки.

2. Да се проучи влиянието на еруфозина върху клоногенността на нормални човешки стволови клетки.

3. Да се изследва дали Erufosine оказва влияние върху миграцията на миеломни клетки.

4. Да се провери дали еруфозинът и другите изследвани вещества оказват влияние върху адхезията на миеломни клетки към фибронектин и остеопонтин и да се разработят нови *in vitro* модели за изследване на адхезията на миеломни клетки към остеобласти и за оценка на способността за инвазивен растеж на миеломните клетки.

5. Да се изследват комбинационните противомиеломни цитотоксични ефекти на изследваните вещества с оглед на откриване на синергистични взаимодействия.

6. Да се получат данни за механизма на противомиеломно действие на изследваните вещества като се проучат промените в сигнално-трансдукционните пътища и типа клетъчна смърт. Да се проучи и влиянието на Erufosine върху структурата и протеиновия състав на мембранните липидни рафтове.

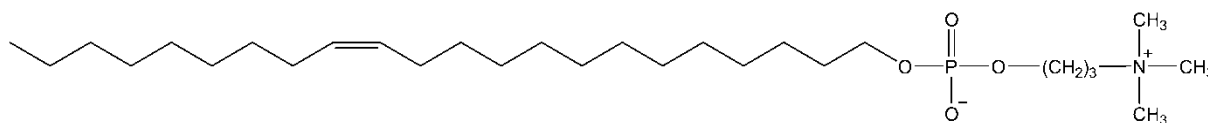
7. Да се проучи повлияването на противомиеломната ефективност на изследваните вещества от различни фактори, обуславящи лекарствена резистентност – присъствие в средата на интерлевкин-6, остеопонтин, фибронектин или други характерни за костно-мозъчната микросреда протеини; повишена активност на сигналния път c-Raf/MEK/ERK; повишено вътреклетъчно ниво на антиапоптотичния протеин Bcl-X_L.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

I. Материали

1. Вещества, прилагани върху миеломните клетки:

➤ Еруцилфосфо-N,N,N-триметилпропиламин (ErPC3, Erufosine):



Съединението е синтезирано и предоставено от проф. Hans-Jörg Eibl, Max-Planck-Institut, Гьотинген, Германия.

➤ Куркумин (диферулоилметан) / Sigma-Aldrich;

➤ Диарсенов триоксид (арсеник, As₂O₃, ATO) / Sigma-Aldrich;

- *Melphalan / Sigma-Aldrich;*
- *Bendamustine hydrochloride (Ribomustin®) / Astellas Pharma;*
- *Bortezomib (Velcade®) / Janssen-Cilag;*
- *Рекомбинантен човешки интерлевкин-6 (rhIL-6) / STEMCELL Technologies;*
- *Рекомбинантен човешки остеоопонтин (rhOPN) / EMP Genetech;*
- *Фибронектин, добит от човешка плазма / Sigma-Aldrich;*
- *U0126 (инхибитор на MEK1/2) / Cell Signaling Technology.*

2. Клетъчни линии

Всички използвани клетъчни линии са от човешки произход и са закупени от DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Германска сбирка от микроорганизми и клетъчни култури), Брауншвайг, Германия:

- *U-266 (DSMZ № ACC 9) – мултиплен миелом;*
- *OPM-2 (DSMZ № ACC 50) – мултиплен миелом;*
- *RPMI-8226 (DSMZ № ACC 402) – мултиплен миелом;*
- *SAOS-2 (DSMZ № ACC 243) – остеогенен сарком;*
- *SKW-3 (KE-37) (DSMZ № ACC 53) – T-клетъчна левкемия.*

3. Кръв от умбиликална вена

Предоставена е от доц. Пламен Тодоров от Ин Витро АГ Медицински Център „Димитров“. Получена е от три родилки след дадено информирано съгласие от тяхна страна.

4. Генетичен материал, използван при провеждане на трансфекционни експерименти

- *флуоресциращ олигонуклеотид Block-iT™ / Invitrogen;*
- *плазмиден вектор pcDNA™3.1(+)/ Invitrogen;*
- *плазмиди pOPN-a и pOPN-b, получени чрез клониране съотв. на ген за синтез на човешки OPN-a или OPN-b във вектора pcDNA3.1(+)* (предоставени от д-р Christina Reufsteck, DKFZ, Хайделберг, Германия);
- *контролни лентивирусни частици copGFP Control Lentiviral Particles и Control shRNA Lentiviral Particles / Santa Cruz Biotechnology;*
- *Bcl-x_L shRNA (h) Lentiviral Particles – лентивирусни частици, носещи ген за интерферираща РНК насочена срещу иРНК за човешки Bcl-X_L / Santa Cruz Biotechnology.*

II. Методи

1. Култивиране на туморни клетки

Клетките са култивирани при стандартни условия: хранителна среда RPMI-1640, обогатена с фетален телешки серум (FBS) и L-глутамин в крайни концентрации съответно 10% и 2 mM; овлажнена атмосфера с 5% въглероден диоксид при температура 37°C. Клетките са поддържани в експоненциална фаза на растеж чрез прибавяне на прясна хранителна среда (суспензионни култури) или цялостна смяна на средата (адхерентни култури) 2-3 пъти седмично. За пространствено разделяне на миеломни от остеобластни клетки при съвместното им култивиране в обща среда са използвани поликарбонатни филтри Millicell®-

PCF с диаметър на порите 0,4 μm . За триизмерно клетъчно култивиране е използвана ротационна биореакторна система RCCS-D с биореакторни модули Synthecon®.

2. *Изолиране на моноклеарни клетки*

Като изходен материал са използвани костно-мозъчен аспират от пациенти с ММ и кръв от умбиликална вена. Използван е методът на центрофугиране в плътностен градиент (Ficoll-PaqueTM PLUS), при което клетките се разделят на фракции в зависимост от теглото и формата си.

3. *Подбор на концентрации на изследваните вещества*

Първоначално са проведени пилотни експерименти с широк диапазон от концентрации с цел да се установи ефективната цитотоксична концентрационна област за всяко изследвано вещество. Като ориентир са ползвани и налични литературни данни за някои от веществата. След това са проведени същинските експерименти, позволяващи прецизно определяне на IC₅₀. По две концентрации, една близка до IC₅₀ и една по-ниска, са използвани при изследване на комбинационните цитотоксични ефекти. При изследване на механизма на действие на веществата са подбирани ефективни цитотоксични концентрации.

4. *MTT-метод за оценяване на виталността и пролиферативната активност на клетъчните култури*

Методът е използван за оценяване на виталността и пролиферативната активност на клетки, подложени на въздействие с различни вещества или комбинации от вещества, както и за оценяване на жизнеспособността на клетки след трансфекция. Клетките се инкубират с разтвор на МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиев бромид), след което образувалите се в жизнените клетки формазанови кристали се разтварят и се определят спектрофотометрично при 550 nm. Отчетената стойност е пропорционална на броя на жизнеспособните клетки.

5. *Оценяване на клоногенността на хемопоеични прогенитори, изолирани от умбиликална кръв*

За да се осигури възможност за диференциация и образуване на колонии от хемопоеичните стволови клетки, съдържащи се в умбиликалната кръв, е използвана специална полутвърда хранителна среда, обогатена с растежни и диференциращи фактори (MethoCult® GF H4434). След изтичане на необходимото време за инкубация (10-14 дни), образувалите се колонии от различни типове са преброени с помощта на фазово-контрастен микроскоп.

6. *Оценяване на миграционната активност на миеломни клетки*

Миграционната активност на миеломните клетки е изследвана в опитна постановка, представляваща разновидност на камерата на Boyden. Отчитан е броят на клетките, преминали през мембрана с диаметър на порите 8 μm в посока към среда, обогатена с хемоатрактант (FBS). За определяне на относителния брой мигрирали клетки е използвано тъмноносиньото багрило ресазурин (CellTiter Blue®), превръщащо се в метаболитно активните клетки в розов резорурфин, който може да се определи флуорометрично с много нисък праг на чувствителност.

7. Оценяване на адхезионната способност на миеломни клетки

От една страна е изследвана адхезионната способност на миеломни клетки към субстратите фибронектин и остеопонтин, адсорбирани върху полистиренова повърхност. В този случай измерването на относителния брой адхерирани клетки е осъществявано чрез оцветяването им с кристалвиолет и последващо спектрофотометрично отчитане. От друга страна е оценявана и способността на миеломните клетки за адхезия към монослой от остеобластни клетки SAOS-2. В случая относителният брой адхерирани клетки е определян чрез имуноблот, използвайки анти тяло срещу протеин, който се експресира от миеломните клетки, но не и от SAOS-2.

8. Имуноблот (Western blot)

Методът е използван за установяване на определени протеини както в самите клетки (след първоначалното им лизиране), така и в кондиционираната от тях среда. Общата белтъчна концентрация във всяка проба е определяна по подходящ метод – по метода на Smith, когато в пробата присъстват детергенти, но не и редуциращи агенти, или по метода на Bradford в обратния случай). Пробите са подлагани на електрофореза в полиакриламиден гел при денатуриращи условия, след което е провеждан електротрансфер на фракционираните протеини върху поливинилидендифлуоридна (PVDF) мембрана. Мембраните са обработвани последователно с първично немаркирано анти тяло срещу търсения протеин и съответно вторично анти тяло, конюгирано с пероксидаза от хрян. Визуализирането на образуваните комплекси антиген-анти тяло е осъществявано чрез хемилуминесцентна реакция, като резултатите са регистрирани трайно върху фотографски филм и впоследствие са анализирани чрез програмата за денситометрия Quantity One. При подходяща възможност е провеждано стрипиране (отстраняване на свързаните анти тела от вече обработените мембрани), за да може мембраните да се маркират отново с други анти тела срещу друг търсен протеин.

9. Имунохистохимия

Този метод е използван за анализ на препарати от триизмерни клетъчни култури. Осъществен е с любезното съдействие на доц. Маргарита Генова от НСБАЛХЗ (Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания).

10. Приготвяне на микроскопски препарати от конвенционални клетъчни култури

Микроскопски препарати от конвенционални суспензионни клетъчни култури са приготвяни в три случая – при изследване на морфологията на клетъчните ядра чрез оцветяване с DAPI (4',6-диамидин-2'-фенилиндол дихидрохлорид), при изследване на ганглиозид GM1-съдържащите мембранни липидни рафтове чрез маркирането им с CTxB-FITC (субединица В на холератоксина, конюгирана с флуоресцеинизотиоцианат) и при оценяване на трансфекционната ефективност, използвайки флуоресцентните свойства на специален контролен олигонуклеотид или протеин.

11. Поточна цитометрия

Използван е поточно-цитометричният метод на Nicoletti като начин за определяне каква част клетки от общата популация имат съдържание на ДНК по-малко от характерното за фаза G1 на клетъчния цикъл – т. нар. суб-G1-фракция, чието нарастване е характерен белег при протичане на апоптоза. Методиката е проведена със съдействието на доц. Маргарита Генова от НСБАЛХЗ.

12. Електрофоретичен анализ на ДНК, изолирана от клетки

Този метод е използван за установяване на евентуална олигонуклеозомна ДНК-фрагментация, която е характерен белег за протичане на апоптоза. ДНК е изолирана от цитозола на контролни нетретирани или третирани с различни вещества миеломни клетки, а също и от ядра на нетретирани миеломни клетки, които са били инкубирани с цитозолен екстракт от третирани клетки SKW-3 (KE-37), податливи на апоптоза под действие на изследваните вещества. Изолираната ДНК е подлагана на електрофореза в агарозен гел, след което е визуализирана чрез оцветяване с етидиев бромид.

13. Изолиране на клетъчни фракции, съдържащи мембранны липидни рафтове

Клетките са лизирани при сравнително меки условия, при които се разрушават клетъчните мембрани, но не и участъците от тях, известни като липидни рафтове. Лизатите са подлагани на ултрацентрифугиране в захарозен градиент, при което липидните рафтове изплуват в по-разредените слоеве. Получените отделни фракции са анализирани чрез имуноблот, при което като способ за доказване на ганглиозид GM1 е използвано маркиране с СТxB-NRP (субединица B на холератоксина, конюгирана с пероксидаза от хрян).

14. Изследване на вътреклетъчното натрупване на As_2O_3

Проникналият в клетките арсен след третиране с As_2O_3 е определян количествено чрез атомно-абсорбционна спектрометрия (ААС). Методът е използван за изучаване на влиянието на куркумина върху натрупването на As_2O_3 в миеломни клетки OPM-2 и е изпълняван с любезното съдействие на проф. Соня Ганева от Химическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“.

15. Полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR)

Този метод е използван за определяне на относителните нива на отделни иРНКи в изследваните клетки. Първоначално от клетките е изолирана тотална РНК, като при нужда е пречиствана от ДНК (когато клетките преди това са били трансфектирани с плазмиди). След това последователно са извършвани обратна транскрипция на съдържащите се иРНКи до кДНКи и амплифициране на специфични ДНК-последователности чрез полимеразна верижна реакция. Продуктите на реакцията са анализирани чрез капилярна електрофореза, използвайки апарат QIAxcel и програмата BioCalculator.

16. Размножаване на плазмиди

Тази процедура беше извършена с цел да се получат нужните количества плазмиди за трансфекция на туморните клетки. Най-напред беше проведена трансформация на химиокомпетентни бактерии *Escherichia coli* с плазмидите. Успешно трансформираниите бактерии бяха размножени, след което плазмидите бяха изолирани от тях и пречистени.

17. Линеаризиране на плазмиди

Плазмидите бяха обработени с рестриктазата PvuI, която ги „срязва“ на специфично място в бета-лактамазния ген, който не е необходим при трансфекция в еукариотни клетки. След това линеаризираните плазмиди бяха пречистени от ензима и другите реакционни компоненти и бяха подложени на електрофоретичен анализ, за да се провери ефективността на рестрикцията.

18. Въвеждане на чужд генетичен материал в еукариотни клетки

Използвани са два различни способа за въвеждане на чужд генетичен материал в туморните клетки – трансфекция и трансдукция. Гени за остеопонтин са въвеждани с посредничеството на плазмиден вектор, като трансфекцията е подпомагана с подходящи химични агенти. Оптимизацията на процеса и контролът върху ефективността му са осъществявани чрез трансфектиране на прицелните клетки с контролен флуоресциращ олигонуклеотид. Ген за интерферираща РНК, насочена срещу иРНК за човешки Vcl-X_L, както и съответни контролни гени (за зелено-флуоресциращия протеин сорGFP и за РНК-секвенция, която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК), са въвеждани в клетките с посредничеството на лентивируси. Наличието в плазмидите и вирусните частици на гени, обуславящи резистентност към определени антибиотици, е използвано за селектиране на клетки, характеризиращи се с трайно интегриране и експресия на чуждия генетичен материал в техния геном.

19. Обработка на експерименталните данни и статистика

Опитните данни за виталността и пролиферативната активност на клетките, за миграционната им активност и за адхезията им към фибронектин и остеопонтин са обработвани с помощта на програмата GraphPad Prism 5.0. Резултатите са представени като процент от съответната нетретирана контрола, като са изчислени и съответните стандартни отклонения. Проведен е анализ на значимостта на различията между стойностите за отделните групи чрез непараметричния статистически тест на Mann-Whitney. След извършване на нелинеен регресионен анализ са получени графики на зависимостите концентрация-ефект и са изчислени IC₅₀-стойностите с 95% доверителен интервал.

19.1. Оценка на комбинационните цитотоксични ефекти

Използван е методът на Webb. Опитно наблюдаваните стойности за преживяемостта на клетките, третирани с комбинация от две вещества (SF_{A+B(набл.)}), са сравнявани с очакваните стойности за преживяемостта, които биха били отчетени, ако дадената комбинация се характеризира с адитивен ефект (SF_{A+B(оч.)}). Тези очаквани стойности са изчислявани по следната формула, където със SF_A и SF_B са означени процентните фракции на преживелите клетки след самостоятелно третиране с веществото А или В спрямо преживелите клетки в нетретираната контрола:

$$SF_{A+B(оч.)} = \frac{SF_A \times SF_B}{100}$$

Ако при P < 0,05 експериментално получената стойност за преживяемостта е под 70% от очакваната, комбинационният ефект е квалифициран като потенциращ синергизъм, а ако е над 130% от очакваната – като антагонизъм.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

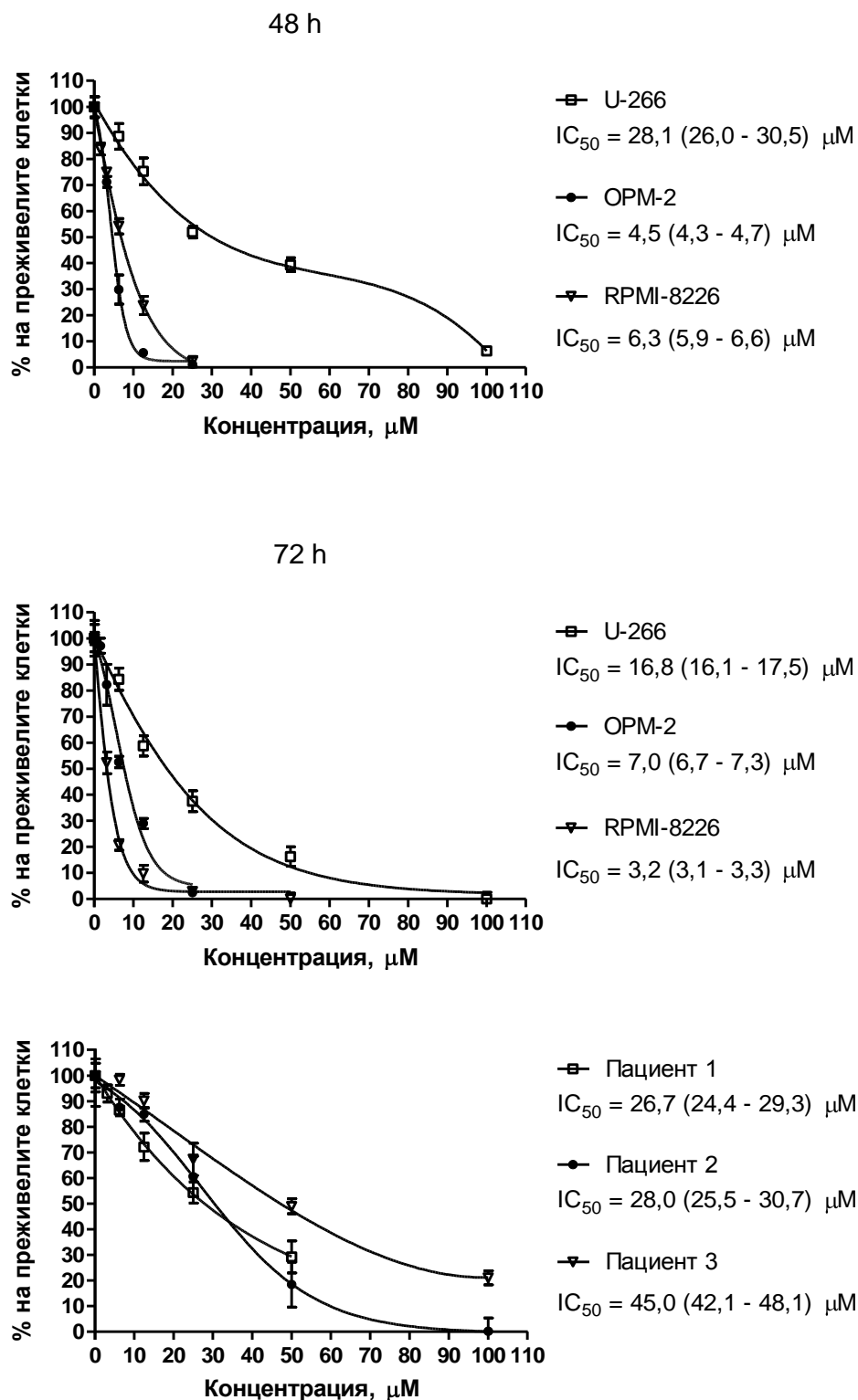
1. Цитотоксични ефекти

1.1. Самостоятелни цитотоксични ефекти на отделните вещества

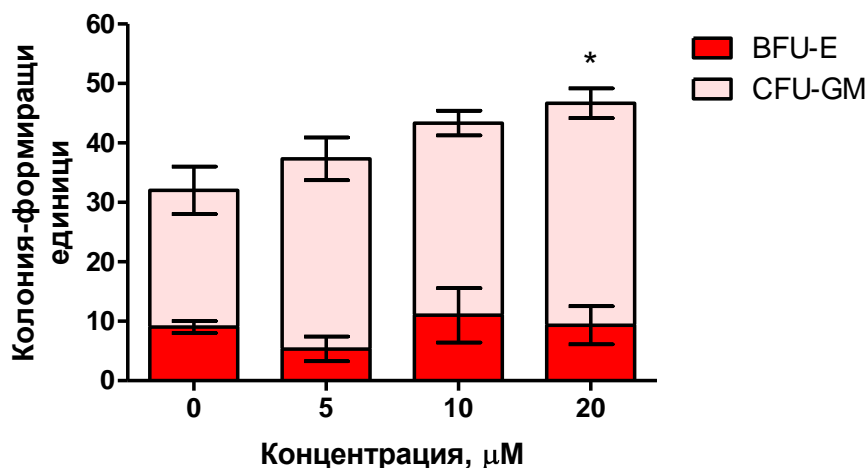
➤ Еруцилфосфо-N,N,N-триметилпропиламин (ErPC3, Erufosine)

Получените от нас резултати показват, че Erufosine проявява значителна цитотоксичност към малигнени плазмоцити (МП) – клетъчни линии или първични култури, изолирани от пациенти с ММ (фиг. 1). С по-висока чувствителност към еруфозин се отличават линиите ОРМ-2 и RPMI-8226. Отчетените за тях IC₅₀-стойности на еруфозина варират между

3 и 7,5 μM при отделните експерименти (48 или 72-часово въздействие с Erufosine). Чувствителността на клетъчната линия U-266 е около 3-4 пъти по-ниска. IC_{50} е още по-висока (до 45 μM) за моноклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с ММ, но това може да се обясни с факта, че тези клетки не са чиста популация само от МП, а както е известно, АФХ не засягат нормалните лимфоцити. Получените данни свидетелстват, че



Фиг. 1. Цитотоксичност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226, както и спрямо моноклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с ММ.



Фиг. 2. Erufosine стимулира нормални човешки стволови клетки, изолирани от пълна връв, да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии. Звездичката обозначава статистически значима разлика спрямо нетретирания контрола ($P < 0,05$).

еруфозинът е почти толкова ефективен срещу миеломните клетки, колкото и перифозинът, според публикуваните за него данни. До същия извод стигнахме и след пряко сравнение на цитотоксичността на Erufosine и Perifosine при клетки OPM-2.

Представените в дисертацията резултати показват за пръв път, че еруфозинът стимулира нормални човешки стволови клетки, изолирани от кръв от умбиликалната вена, да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии (фиг. 2). След въздействие с 20 μM еруфозин, броят на образувалите се колонии от този вид е с 62% по-голям, отколкото в нетретирания контролна група ($P < 0,05$), а образуването на проеритробластни (BFU-E) колонии не се повлиява. Установените факти отварят нова перспектива за употреба на Erufosine не само като антинеопластично лекарство, но и при трансплантацията на хемопоеични стволови клетки.

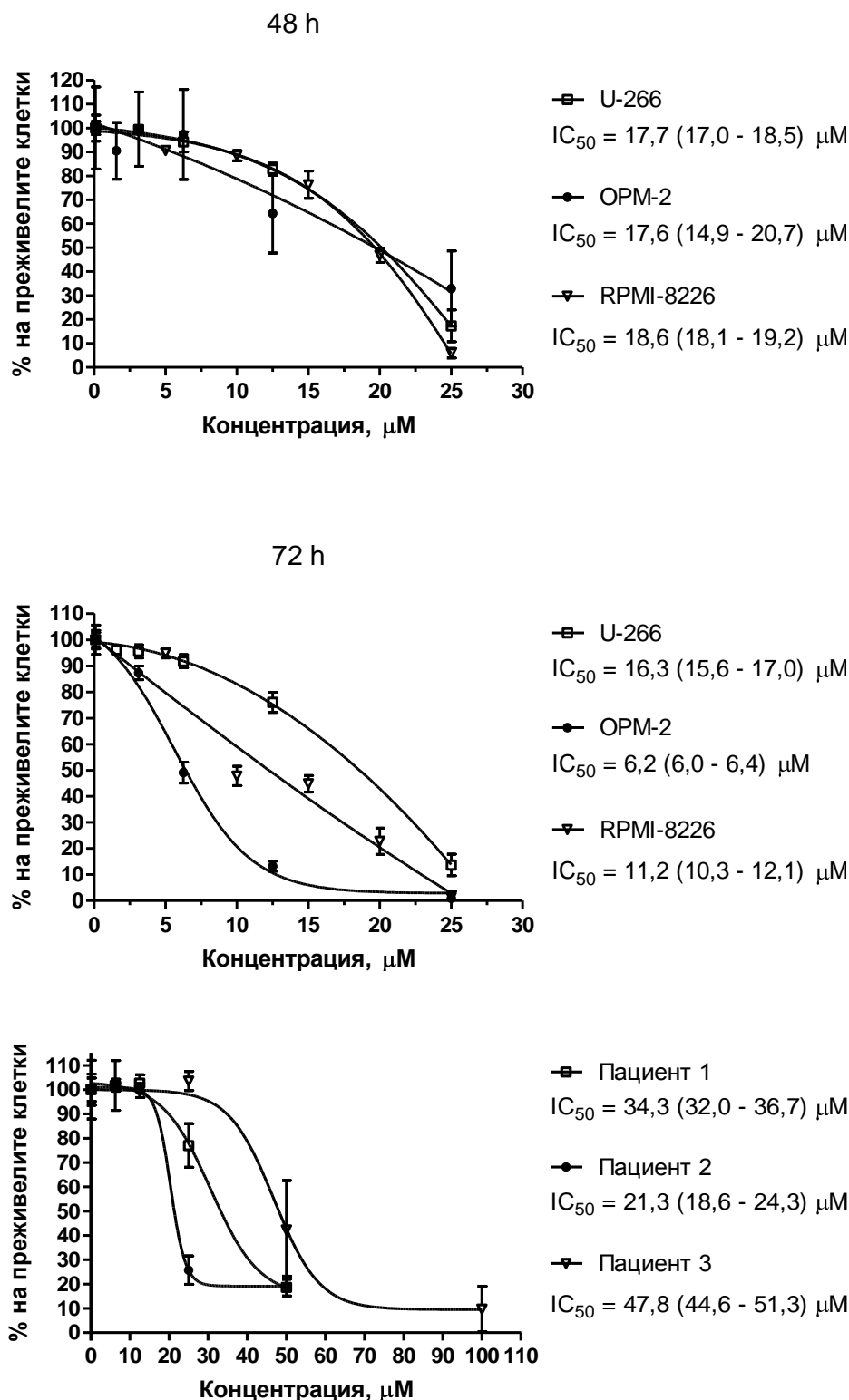
➤ *Куркумин (диферулоилметан)*

Получените от нас резултати показват, че миеломните клетъчни линии U-266, RPMI-8226 и OPM-2 имат сходна чувствителност към куркумин, когато той е приложен за 48 часа (фиг. 3). IC_{50} -стойностите в случая са между 15 и 21 μM . При по-дълго време на въздействие (72 h) куркуминът е най-ефективен срещу клетки OPM-2 ($IC_{50} \approx 6,2 \mu\text{M}$), помалко срещу RPMI-8226 ($IC_{50} \approx 11,2 \mu\text{M}$) и най-малко срещу U-266 ($IC_{50} \approx 16,3 \mu\text{M}$). Още по-ниска ефективност се наблюдава спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с ММ (фиг.3), но това отново може да се обясни с факта, че тези клетки не са чиста популация само от МП.

➤ *Диарсенов триоксид (арсеник, As_2O_3 , АТО)*

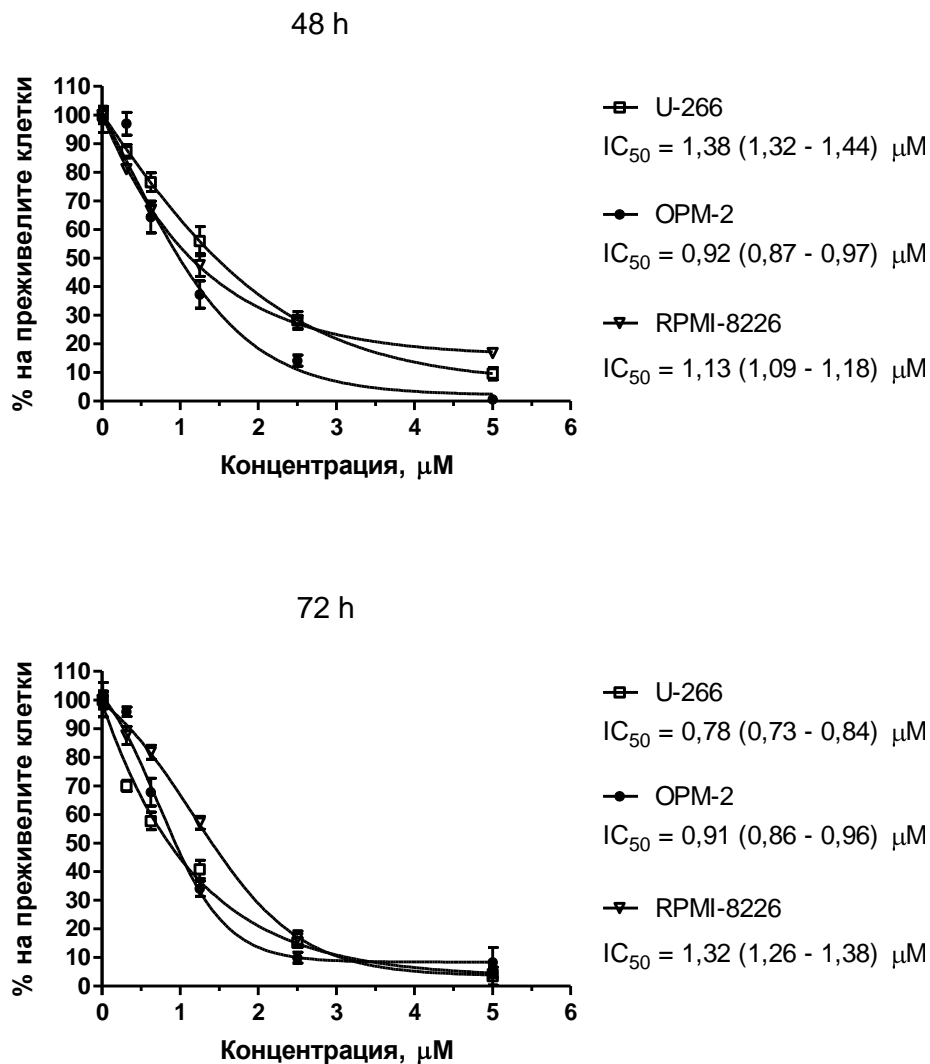
Според нашите данни трите изследвани миеломни клетъчни линии имат сходна чувствителност към As_2O_3 , като IC_{50} -стойностите попадат в интервала между 0,75 и 1,4 μM , независимо дали As_2O_3 е бил приложен за 48 или 72 часа (фиг. 4).

Представените в дисертацията резултати показват, че от трите изследвани миеломни клетъчни линии RPMI-8226 е най-малко чувствителна към широко използваните в клинич-



Фиг. 3. Цитотоксичност на куркумин спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226, както и спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с ММ.

ната практика Melphalan и Bortezomib. Бендамустинът също има ниска ефективност срещу тези клетки. В същото време, те са много чувствителни към алкилфосфохолина Erufosine. От друга страна, клетките U-266 са най-чувствителни към алкилиращи цитостатици и бор-



Фиг. 4. Цитотоксичност на диарсенов триоксид спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226.

тезомиб, но най-резистентни към еруфозин и куркумин. Клетъчната линия OPM-2 е най-чувствителна към куркумин, а също е много чувствителна и към бортезомиб (колкото U-266) и еруфозин (колкото RPMI-8226). Тя обаче е сравнително резистентна към Vendamus-tine. Прави впечатление различният спектър на активност на клинично използваните лекарства от една страна, и на експерименталните вещества с противомиеломно действие от друга. Тези данни показват ясно перспективата, която би се открила при въвеждане на тези вещества в клиничната практика, а именно – лечение на болни с ММ, развили резистентност към стандартната терапия.

1.2. Комбинационни цитотоксични ефекти при едновременно приложение на две вещества

Интерес представлява откриването на синергистични комбинации, реализиращи по-голям цитотоксичен ефект от сумата на ефектите на отделните вещества. Рационални са и адитивните комбинации от две вещества с различаващ се профил на токсичност, защото позволяват постигането на единица противотуморен ефект при по-ниски дози на отделните компоненти и следователно при по-ниска токсичност.

Въз основа на получените резултати може да се състави следната класификация на изследваните от нас комбинации:

А. Синергистични (суперадитивни) комбинации. Като такива могат да се определят комбинациите на еруфозин или куркумин с бендамустин, мелфалан или бортезомиб, въпреки че има някои изключения по отношение на отделни клетъчни линии.

Съвместното приложение на Erufosine и Vendamustine се характеризира с взаимно potenziране на цитотоксичните им ефекти при клетки U-266 и особено при RPMI-8226 (фиг. 5). Спрямо клетки OPM-2 обаче, комбинацията е адитивна. Комбинацията Erufosine + Melphalan е синергистична срещу клетъчната линия U-266, но адитивна до слабо антагонистична спрямо OPM-2 и RPMI-8226. Съвместното приложение на Erufosine и Bortezomib се характеризира с взаимно potenziране на цитотоксичните им ефекти и при трите изследвани миеломни клетъчни линии, но най-вече при RPMI-8226 (фиг. 6). Възможно е причината за наблюдавания синергизъм да се корени от една страна в описаната способност на АФХ да неутрализират повишаването на степента на фосфорилиране на Akt, предизвикано от бортезомиб, а от друга – в описаната способност на Bortezomib да неутрализира повишаването на степента на фосфорилиране на ERK, предизвикано от АФХ.

Комбинацията куркумин + бендамустин е подчертано синергистична при всички изследвани миеломни клетъчни линии (фиг. 7). Съвместното приложение на куркумин и мелфалан се характеризира с взаимно potenziране на цитотоксичните им ефекти при клетки U-266, докато комбинационният ефект при OPM-2 и RPMI-8226 е по-скоро адитивен. Резултатите от нашите изследвания сочат, че комбинацията куркумин + Bortezomib е подчертано синергистична срещу миеломните клетъчни линии OPM-2 и RPMI-8226, докато синергизъм при U-266 се наблюдава само при определени концентрации (фиг. 8). Вероятна причина за синергизма в този случай е фактът, че двете вещества инхибират активността на транскрипционния фактор NF-κB по различни механизми. Освен това е известно, че куркуминът потиска фосфорилирането на STAT3, което вероятно също повишава чувствителността на клетките към цитостатици.

Легенда към фиг. 5., 6., 7., 8., 9. и 10.:

E – Erufosine;

Bnd – Vendamustine;

Brt – Bortezomib;

C – Curcumin;

ATO – As₂O₃;

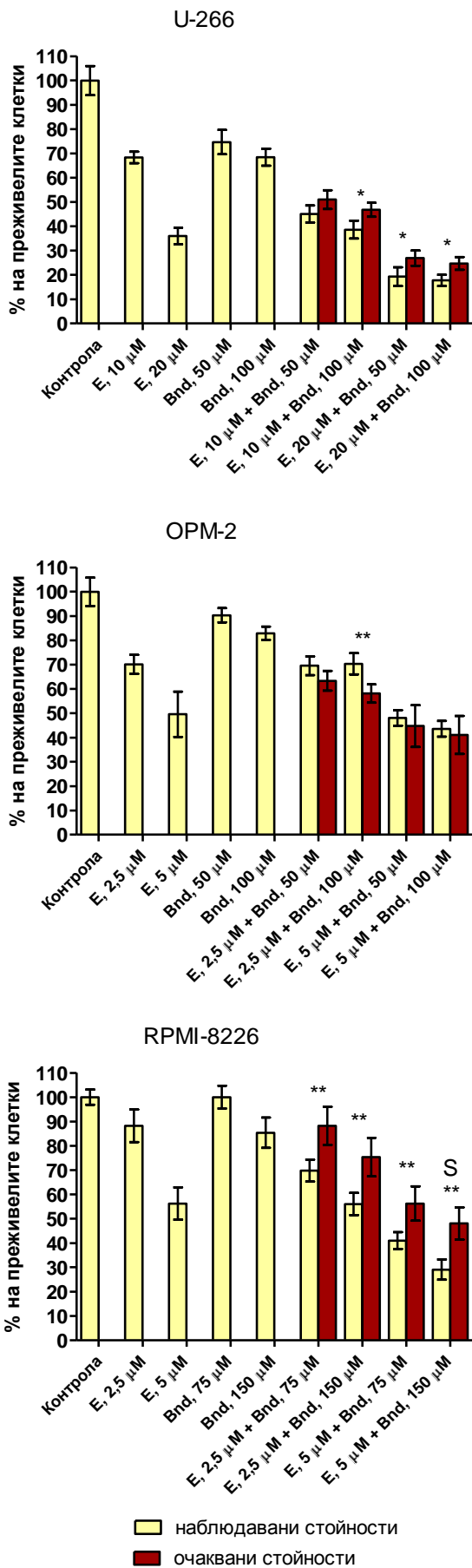
една звездичка – статистически значима разлика ($P < 0,05$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(набл.)}$);

две звездички – статистически значима разлика ($P < 0,01$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(набл.)}$);

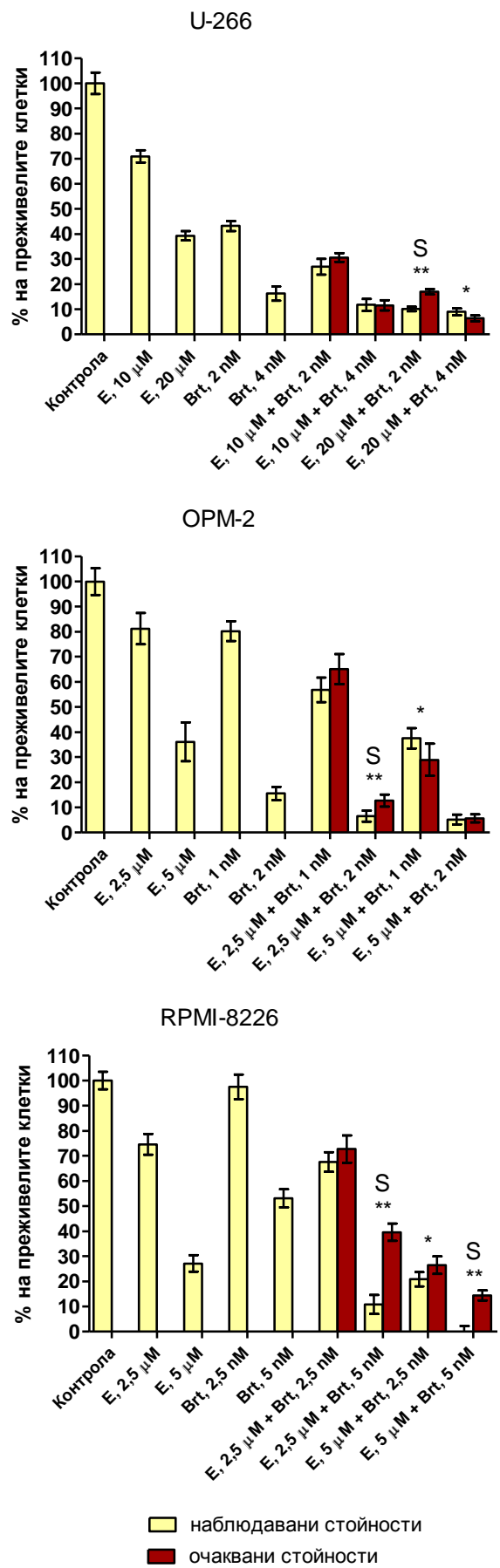
S – синергистично potenziране на цитотоксичния ефект ($SF_{A+B(набл.)} \leq 0,7 \times SF_{A+B(оч.)}$);

A – антагонизъм ($SF_{A+B(набл.)} \geq 1,3 \times SF_{A+B(оч.)}$).

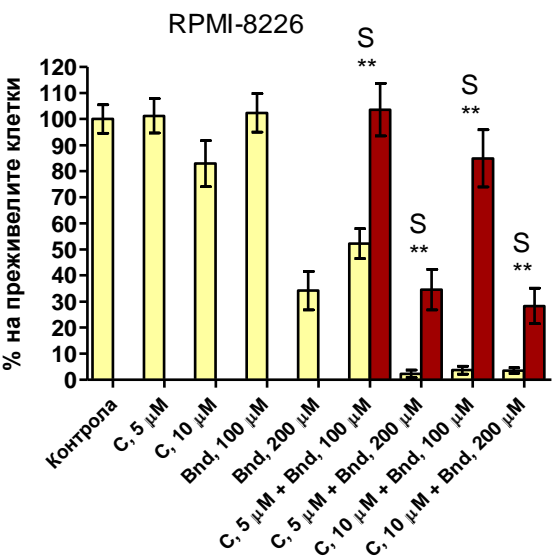
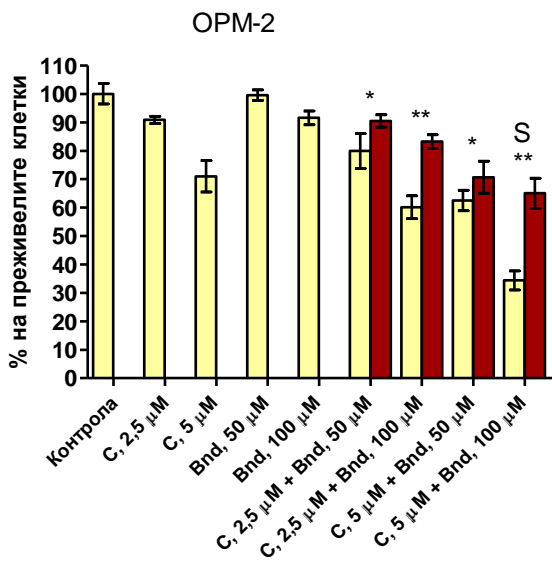
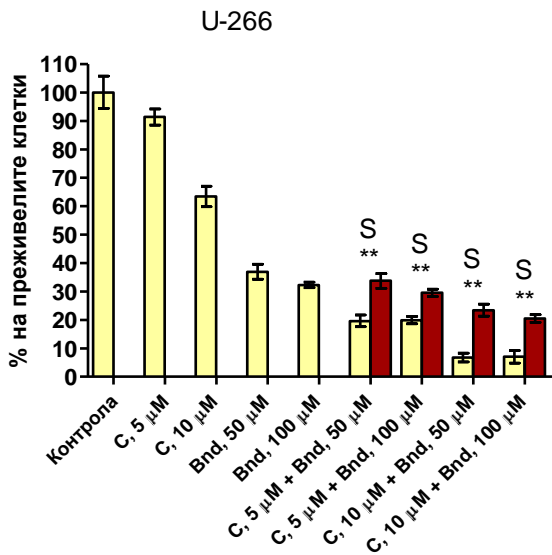
Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с двете вещества.



Фиг. 5. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и Vendamustine. Легенда: стр. 15.

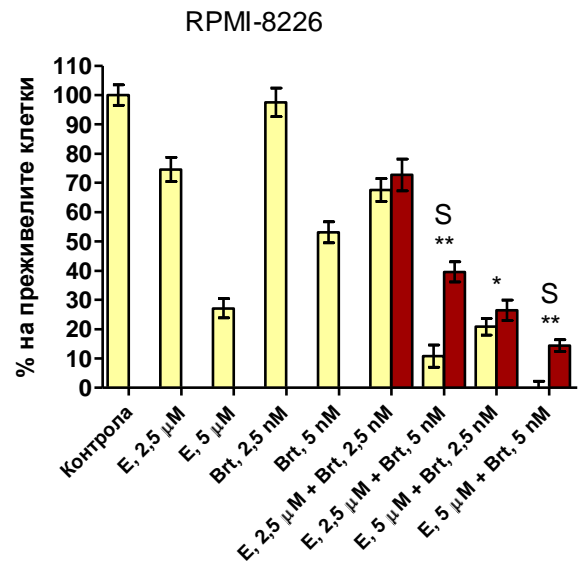
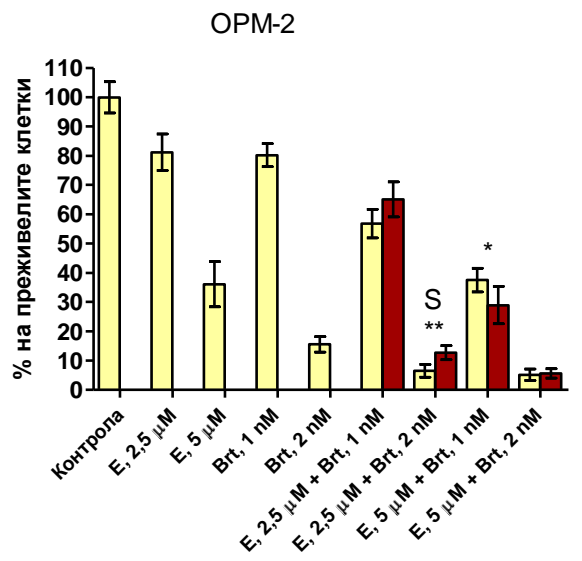
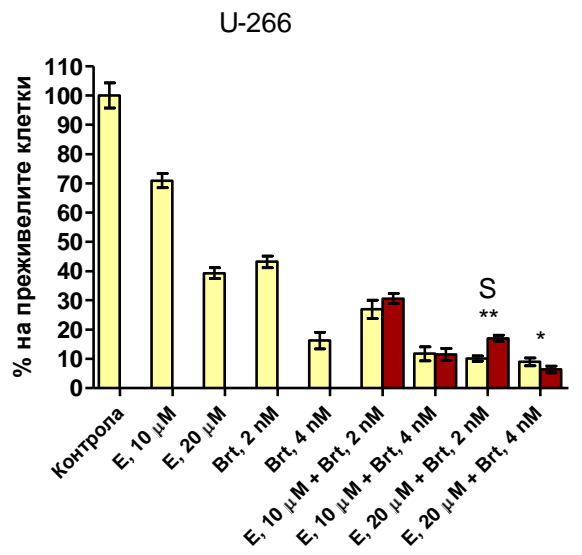


Фиг. 6. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и Bortezomib. Легенда: стр. 15.



■ наблюдавани стойности
■ очаквани стойности

Фиг. 7. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и Bendamustine. Легенда: стр. 15.



■ наблюдавани стойности
■ очаквани стойности

Фиг. 8. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и Bortezomib. Легенда: стр. 15.

Б. Адитивни комбинации. Като такива могат да се определят комбинациите на As_2O_3 с бендамустин, мелфалан или бортезомиб, както и на бортезомиб с мелфалан или бендамустин, въпреки че има някои изключения по отношение на отделни клетъчни линии.

Комбинацията As_2O_3 + Melphalan е адитивна и при трите миеломни клетъчни линии, но при RPMI-8226 се наблюдава известно взаимно потенциране на цитотоксичните ефекти, а при OPM-2 – тенденция към проява на антагонизъм. Съвместното приложение на As_2O_3 и Bendamustine се характеризира с адитивно сумиране на цитотоксичните им ефекти и при трите изследвани миеломни клетъчни линии, но при RPMI-8226 се забелязва тенденция за проява на синергизъм. Комбинацията As_2O_3 + Vortezomib е адитивно цитотоксична срещу клетки RPMI-8226, но при по-високи концентрации се наблюдава синергистичен ефект. Комбинацията е адитивно цитотоксична и срещу клетки U-266, но когато диарсеновият триоксид е приложен в сравнително ниска концентрация се забелязва тенденция за проява на антагонизъм.

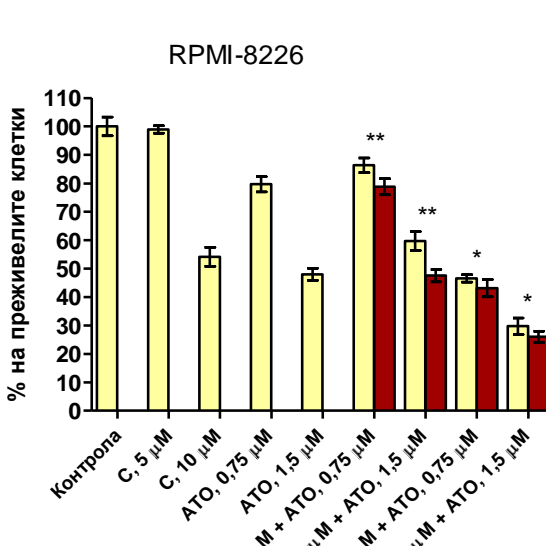
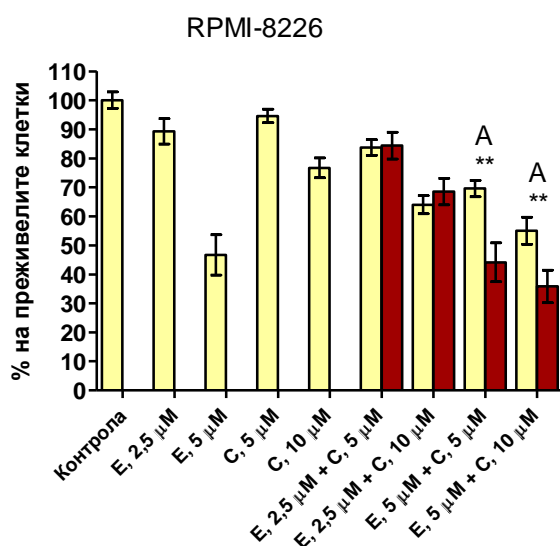
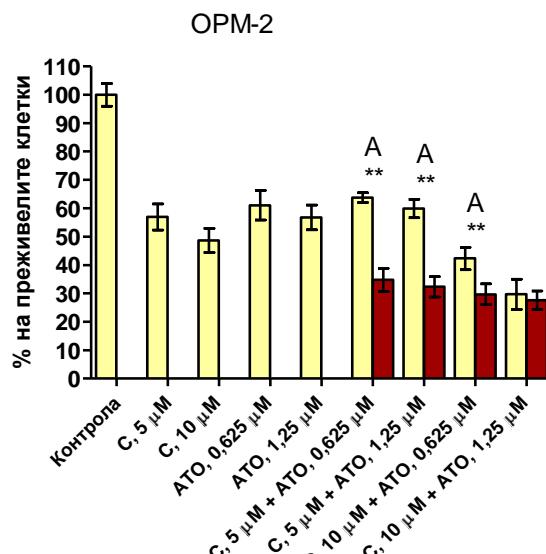
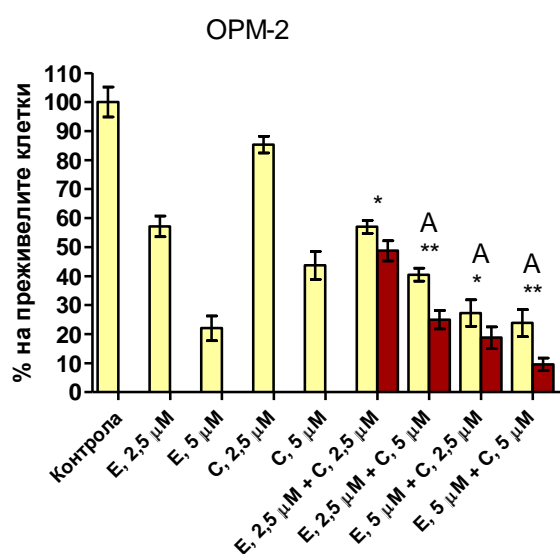
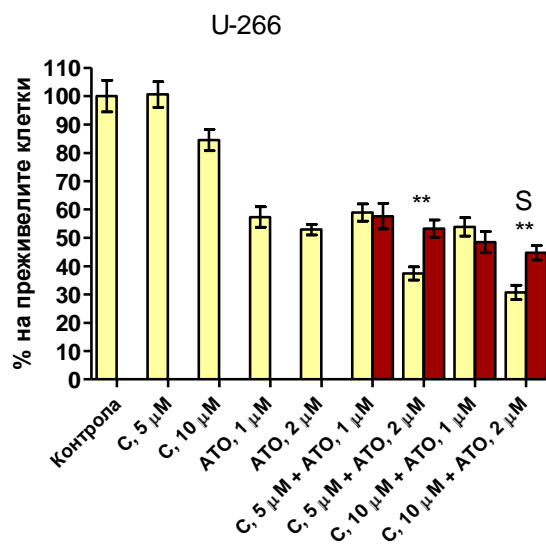
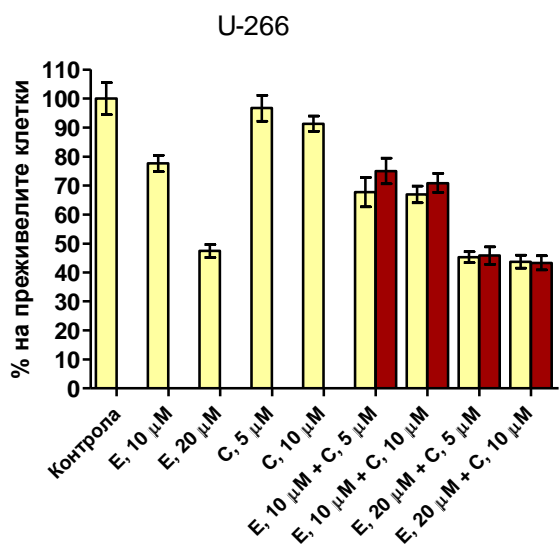
Съвместното приложение на Vortezomib и Melphalan в общия случай се характеризира с адитивно сумиране на цитотоксичните им ефекти, но при високи концентрации се наблюдава синергистичен ефект срещу U-266. Комбинацията Vortezomib + Bendamustine в общия случай е адитивна и при трите миеломни клетъчни линии, но при определени концентрации настъпва взаимно потенциране на цитотоксичните ефекти.

В. Антагонистични комбинации. Като такива могат да се окачествят комбинациите на еруфозин с куркумин или As_2O_3 , както и на куркумин с As_2O_3 , въпреки че има някои изключения по отношение на отделни клетъчни линии.

Комбинацията Erufosine + куркумин е антагонистична при клетки OPM-2, а също и при клетки RPMI-8226 в случаите, когато еруфозинът е приложен в сравнително висока концентрация (по-висока от IC_{50}). Спрямо клетки U-266 комбинацията се характеризира с адитивност на цитотоксичните ефекти на отделните вещества (фиг. 9). Може да се изкаже хипотезата, че антагонистичното взаимодействие между еруфозина и куркумина протича на нивото на киназата JNK, тъй като от една страна фосфорилирането на JNK е ключов механизъм при индуциране на апоптоза от АФХ, а от друга страна е известно, че куркуминът може да инхибира JNK. Антагонистичен ефект при комбиниране на Erufosine и As_2O_3 се наблюдава при клетки U-266, а в определени концентрации и при RPMI-8226. Комбинацията обаче е адитивно цитотоксична спрямо клетки OPM-2 и е синергистична спрямо клетки RPMI-8226 в случаите, когато еруфозинът е приложен в сравнително ниска концентрация (по-ниска от IC_{50}).

Комбинацията куркумин + As_2O_3 е подчертано антагонистична при клетки OPM-2 (фиг. 10). Тенденция за проява на антагонизъм се наблюдава и при клетки RPMI-8226. Когато As_2O_3 е в сравнително висока концентрация (по-висока от IC_{50}) се проявява синергистичен цитотоксичен ефект спрямо клетки U-266. Антагонистичното взаимодействие между куркумина и диарсеновия триоксид би могло да се обясни със свойството на куркумина, бидейки антиоксидант и индуктор на PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимераза), да неутрализира As_2O_3 -индуцираното увреждане на ДНК. Освен това куркуминът би могъл да инхибира JNK и така да възпрепятства индуцирането на апоптоза от страна на As_2O_3 .

Може да се обобщи, че като особено перспективно за противомиеломната терапия се очертава комбинирането на еруфозин или куркумин с алкилиращи цитостатици или борте-



наблюдавани стойности
 очаквани стойности

наблюдавани стойности
 очаквани стойности

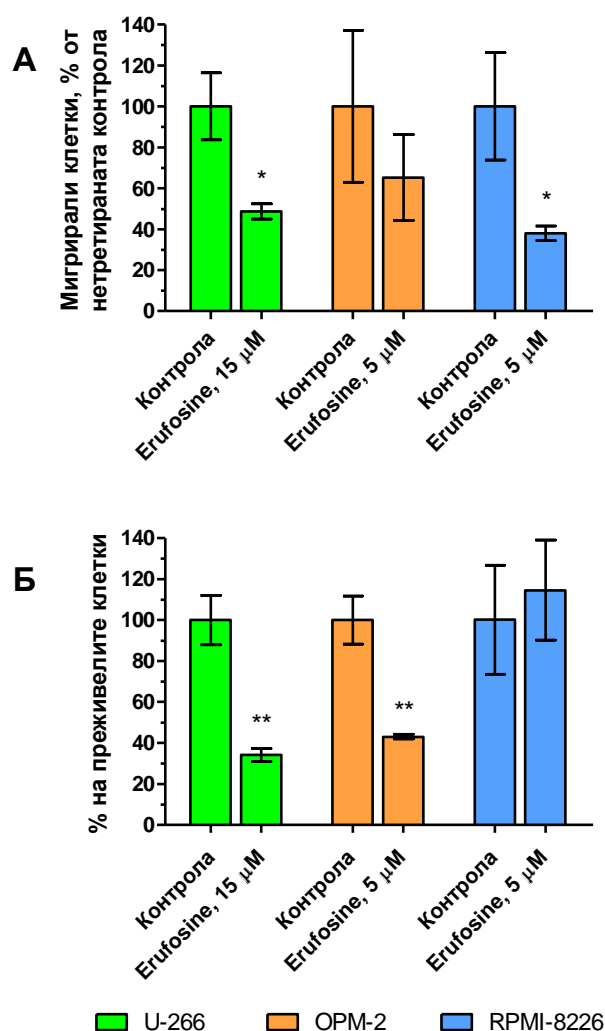
Фиг. 9. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и куркумин. Легенда: стр. 15.

Фиг. 10. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и As₂O₃. Легенда: стр. 15.

зомиб. Може да се очаква, че подобни комбинации ще повишат честотата и продължителността на ремисиите и ще понижат честотата на нежеланите лекарствени реакции. От много голямо значение изглежда възможността за намаляване на случаите на миелосупресия чрез включване на Erufosine в терапевтичните схеми. Комбинирането на As_2O_3 с алкилатори или бортезомиб също изглежда целесъобразно, а терапевтични схеми, съчетаващи алкилатори с бортезомиб, вече са доказали своята ефективност в клинични проучвания.

2. Антимиграционен ефект на еруфозина

Според съвременните схващания за биологията на ММ, миеломните клетки са силно зависими от костно-мозъчната микросреда. Ето защо, за да е максимално успешна една терапевтична стратегия тя трябва да включва потискане на способността на МП да мигрират и да се установяват в костно-мозъчната микросреда. Нашите резултати за пръв път демонстрират антимиграционен ефект на Erufosine, като показват, че този АФХ специфично инхибира миграцията на миеломни клетки RPMI-8226 (51,3% понижение на броя мигрирали клетки) в концентрация, която няма пряк цитотоксичен ефект (фиг. 11). Потискане на миг-

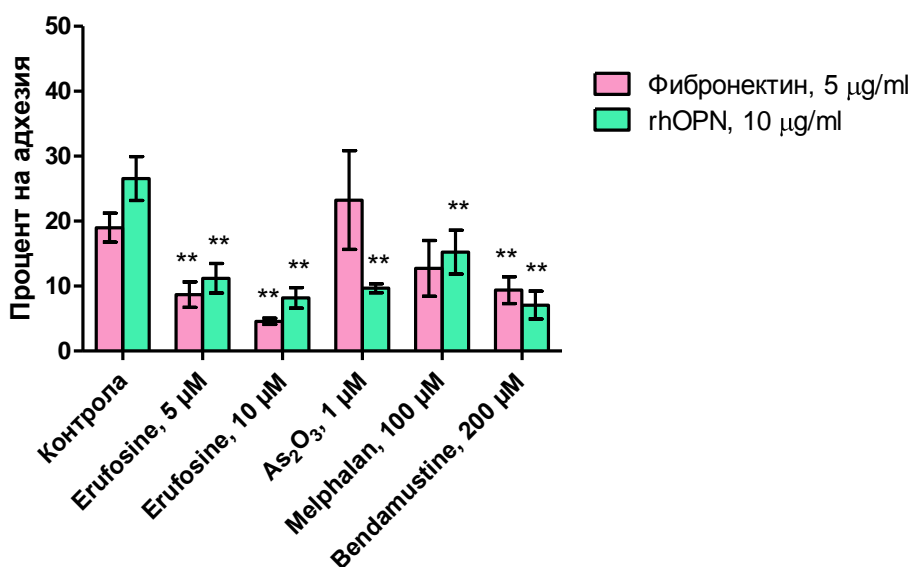


Фиг. 11.А. Потискане на миграционната активност на миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226 след третиране с Erufosine. **Б.** Преживяемост на клетките, останали в горния компартимент на миграционната постановка след изтичане на времето за миграция. Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана контрола. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

рацията се наблюдава и при другите две миеломни клетъчни линии, но в случая се отчита и пряк цитотоксичен ефект, който сам по себе си може да е отговорен за по-малкия брой мигрирали клетки.

3. Инхибиране на адхезионната способност

Известно е, че еруфозинът потиска адхезията на миеломни клетки MM.1S към фибронектин. Представените в настоящата дисертация данни свидетелстват, че еруфозинът също има антиадхезионен ефект и инхибира адхезията на миеломни клетки RPMI-8226 към фибронектин и остеопонтин (фиг. 12). Подобен ефект има и Bendamustine. Мелфаланът и диарсеновият триоксид потискат адхезията на клетки RPMI-8226 само към остеопонтин.



Фиг. 12. Влияние на различни вещества върху способността на клетки RPMI-8226 за адхезия към полистиренова плака покрита със слой от човешки фибронектин или остеопонтин (rhOPN). Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана контрола ($P < 0,01$).

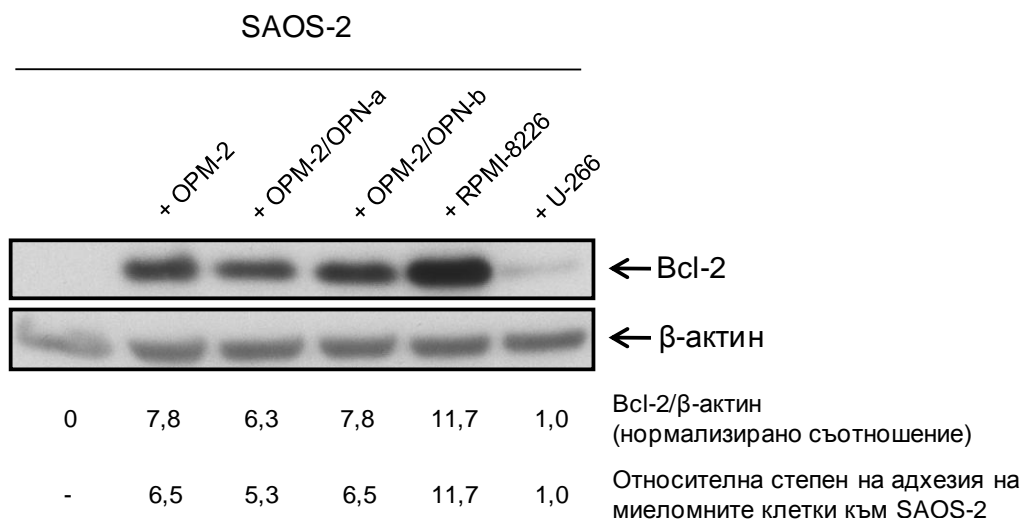
4. Разработване на *in vitro* модели за изследване на взаимодействието между миеломни клетки и остеобласти

Нашите изследвания показват при пряко сравнение, че разликата между миеломните и остеобластните клетки по отношение на експресията на антиапоптотичния протеин Bcl-2 е много голяма. Освен това близкият контакт на миеломните клетки с остеобластите не стимулира последните да експресират по-голямо количество Bcl-2. Тези данни показват, че е налице възможност за отдиференциране на двата типа клетки в смесена популация чрез използване на специфични антитела срещу Bcl-2. Тази възможност беше използвана от нас за разработване на два *in vitro* модела – съответно за изследване на адхезионните или инвазивните свойства на миеломните клетки.

Създаденият *модел за изследване на адхезията на МП към остеобластни клетки* се свежда до предварително отглеждане на монослой от клетки SAOS-2, добавяне към него на миеломни клетки за определено време, отмиване на неприкрепилите се миеломни клетки и определяне на относителното ниво на Bcl-2 в клетките от фиксирания слой, използ-

вайки стандартна процедура за имуноблот. Предимство на модела е, че не е нужно миеломните клетки да бъдат маркирани по някакъв начин (например с багрило или чрез въвеждане в тях на чужд ген), с което се избягва външно влияние върху отнасянията им. Резултати, получени при използване на модела, показват, че от трите изследвани миеломни клетъчни линии RPMI-8226 се отличава с най-голям афинитет за адхезия към клетки SAOS-2, следвана от OPM-2 и U-266 (фиг. 13). Силно изразената склонност за адхезия на клетките RPMI-8226 би могла да се обясни с известния факт, че те свръхекспресират c-MAF, което от своя страна се свързва с повишена експресия на интегрин b7. Представените в дисертацията данни показват също, че повишаването на секрецията на остеопонтин не влияе съществено върху способността на миеломните клетки за адхезия към остеобластите.

През последните години беше постигнат значителен напредък в триизмерното клетъчно култивиране при използване на въртящи се биореактори, създаващи условия на микрогравитация. Създаденият на тази база от нас оригинален *модел за изследване на инвазивните свойства на миеломните клетки* се свежда до предварително отглеждане на сфероиди от клетки SAOS-2 във въртящ се биореактор, добавяне в реактора на миеломни клетки за определено време, изготвяне на хистологични препарати от сфероидите и имунохистохимично оцветяване на препаратите с антитяло срещу Vcl-2. Резултати, получени при използване на модела, онагледяват инвазията на миеломни клетки в сфероидите.



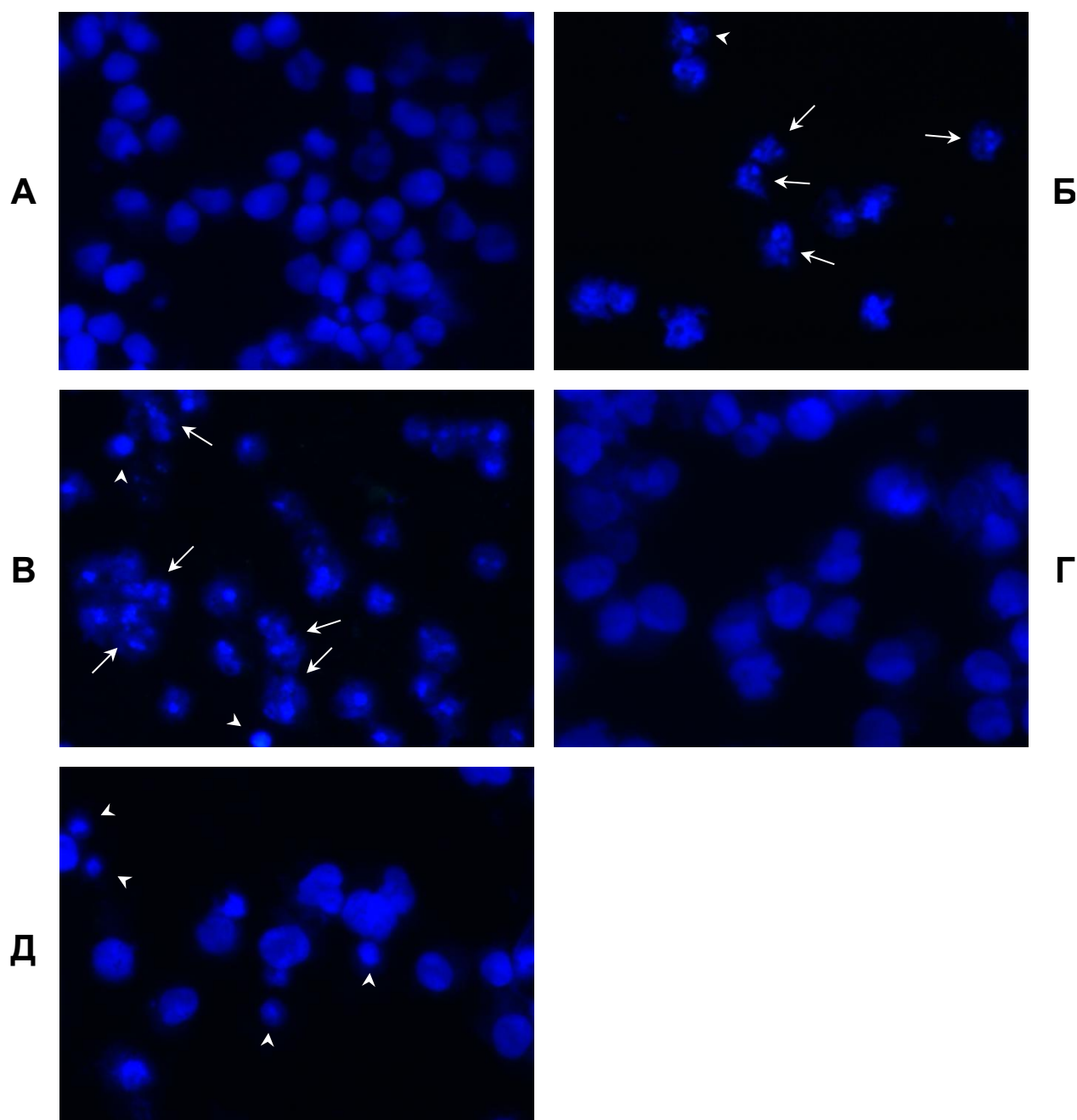
Фиг. 13. Имуноблот, показващ относителната степен на адхезия на миеломни клетки към туморно-трансформирани остеобласти SAOS-2. Съотношенията Vcl-2/β-актин при използване на клетъчна линия OPM-2 и производните ѝ са разделени на фактор 1,2, за да се компенсира за по-високото ниво на Vcl-2 в тези клетки, отколкото в RPMI-8226 или U-266.

5. Механизъм на действие на изследваните вещества

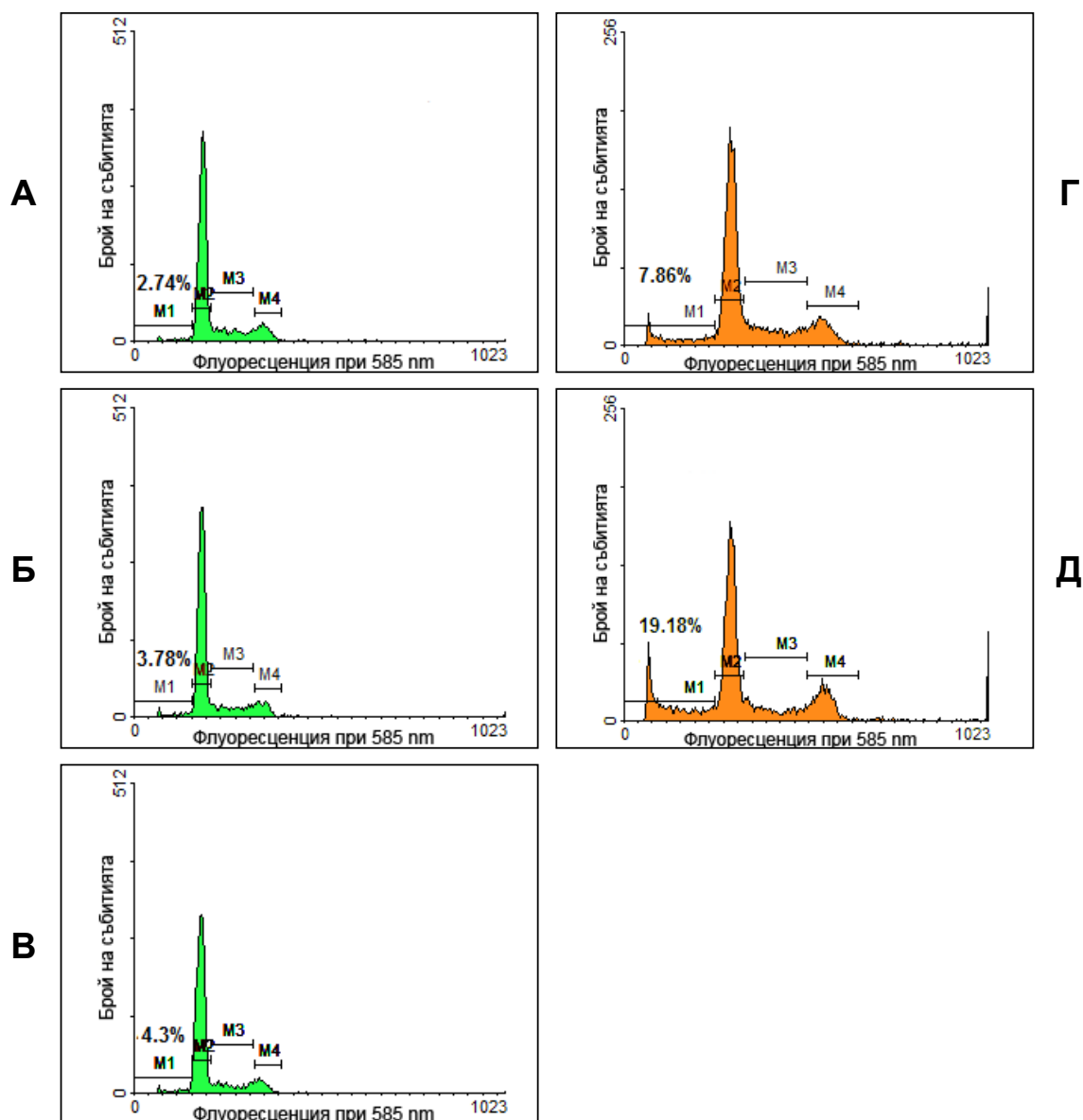
5.1. Индуциране на апоптоза

В хода на проведените изследвания беше установено, че използваните миеломни клетъчни линии реагират по различен начин след третиране с цитотоксична концентрация еруфозин. Например при U-266 не настъпват изменения в морфологията на клетъчните ядра, докато при OPM-2 се наблюдават кариопикноза и кариорексис (фиг. 14), а при RPMI-

8226 – само кариопикноза. Промените при ОРМ-2 настъпват сравнително бързо (още на 16-ия час), което е характерно за апоптозата. Тези данни се подкрепят от резултатите, получени при поточно-цитометричното изследване, показващи значително нарастване на суб-G1-фракцията при клетки ОРМ-2, но не и при U-266 (фиг. 15). Освен това не беше наблюдавано образуване на „стълбица“ от ДНК-фрагменти след гел-електрофореза на ДНК, изолирана от клетки U-266 или RPMI-8226, третирани с Erufosine. Образуване на такава „стълбица“ се оказва възможно след инкубиране на ядра от тези клетки с цитозолен екстракт от предварително третирани с еруфозин клетки SKW-3 (KE-37) (фиг. 16). Това по-



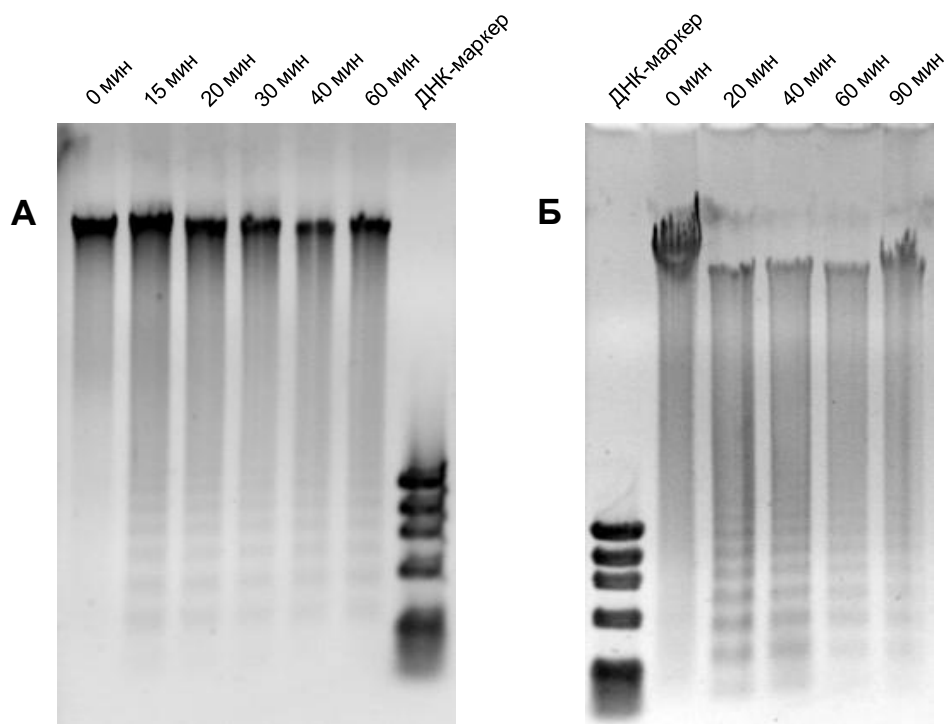
Фиг. 14. Клетъчни ядра от миеломни клетки ОРМ-2, оцветени с DAPI. А – нетретирани клетки; Б – третирани с 15 μM Erufosine за 16 часа; В – третирани с 15 μM Erufosine за 24 часа; Г – третирани с 50 μM Bendamustine за 48 часа; Д – третирани със 100 μM Bendamustine за 48 часа; върхове на стрелки – кариопикноза (свиване и уплътняване на ядрата); цели стрелки – кариорексис (ядрена фрагментация).



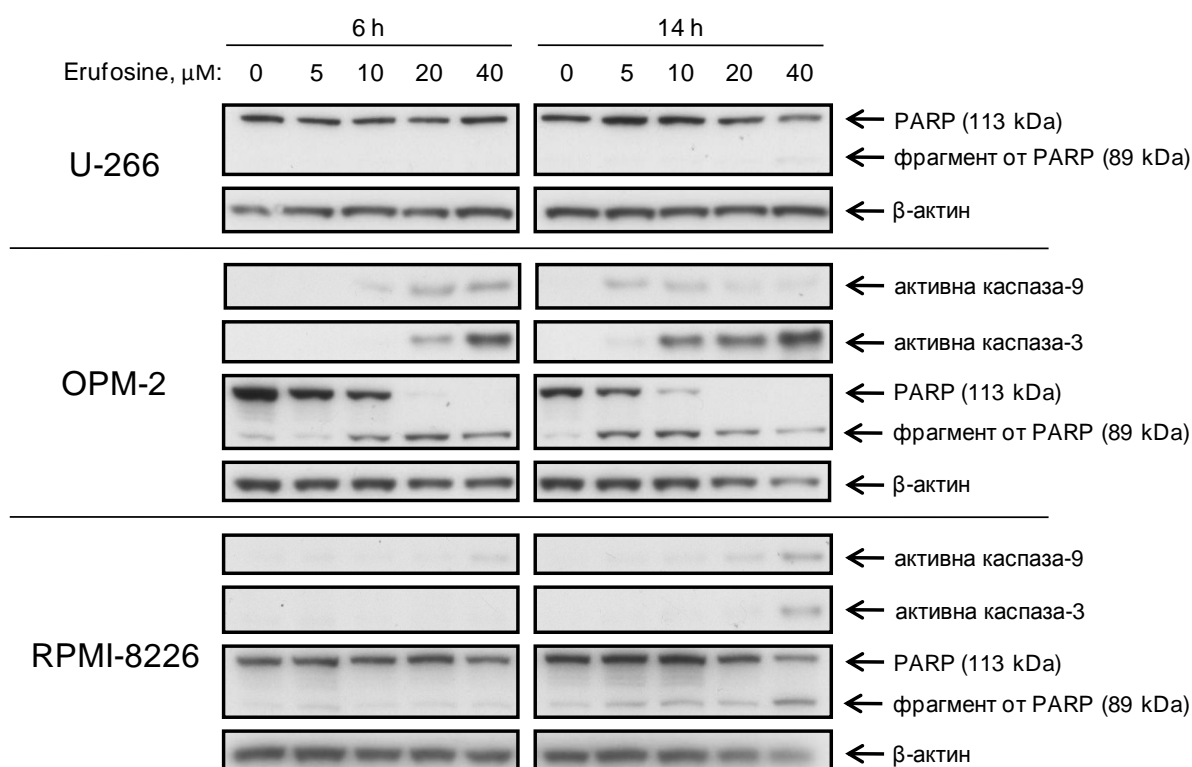
Фиг. 15. Резултати от поточно-цитометрично изследване по Nicoletti на способността на Erufosine да предизвиква апоптоза при миеломни клетки. А – неретирани U-266; Б – U-266, третирани с 20 μM Erufosine за 24 часа; В – U-266, третирани с 30 μM Erufosine за 24 часа; Г – неретирани ОРМ-2; Д – ОРМ-2, третирани с 10 μM Erufosine за 24 часа. Означения: М1 – суб-G1-фракция; М2 – клетки в G1-фазата на клетъчния цикъл; М3 – клетки в S-фазата на клетъчния цикъл; М4 – клетки в G2-фазата на клетъчния цикъл. Към всяка хистограма е даден съответният процентен дял на суб-G1-фракцията.

казва, че причината в клетки U-266 и RPMI-8226 да не настъпва олигонуклеозомна фрагментация под действие на Erufosine е с извънядрен произход, например свръхекспресия на антиапоптотични протеини или свръхактивност на някои цитокинови рецептори.

Най-показателни са получените преки данни за активиране на апоптотичните каскади (фиг. 17). В клетки ОРМ-2 под действие на еруфозина се активират и външният, и вътрешният път на апоптозата. Еруфозинът не индуцира апоптоза в клетки U-266, което предполага друг механизъм на цитотоксичния ефект при тези клетки. Въпреки че ОРМ-2 и RPMI-8226 имат сходна чувствителност към цитотоксичния ефект на еруфозина, минималната



Фиг. 16. Резултати от гел-електрофореза на ДНК, изолирана от ядра на клетки U-266 (А) или RPMI-8226 (Б), след инкубиране на ядрата с цитозолен екстракт от клетки SKW-3 (KE-37), предварително третирани с Erufosine (20 μ M) за 24 часа. Над снимките е обозначено времето на инкубация на отделните проби.



Фиг. 17. Въздействие на Erufosine върху апоптотичните каскади в миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Клетките са третирани с Erufosine в концентрации до 40 μ M за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са подложени на имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби.

концентрация Erufosine, която предизвиква апоптоза при RPMI-8226, е значително по-висока, отколкото при OPM-2. Това говори за участието на неапоптотични механизми и при реализирането на цитотоксичния ефект на Erufosine срещу клетки RPMI-8226.

Известно е, че антиапоптотичните протеини Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 придават лекарствена резистентност при MM. Представените в дисертацията резултати показват, че нивото на Bcl-X_L в клетки U-266 е 11,6 пъти по-високо, отколкото в клетки OPM-2, и 8,9 пъти по-високо, отколкото в клетки RPMI-8226. Нивото на Mcl-1_L в U-266 е 1,7 пъти по-високо, отколкото в OPM-2, и 3,8 пъти по-високо, отколкото в RPMI-8226. Забелязва се, че податливостта на трите изследвани миеломни клетъчни линии към апоптоза, инициирана от Erufosine, е обратно пропорционална на нивата на тези протеини. От трите изследвани клетъчни линии единствено OPM-2 реагира с разграждане на Bcl-2 след въздействие с Erufosine. Получава се фрагмент с молекулна маса 23 kDa. Наблюдава се и значително понижаване на нивото на Mcl-1. Фрагментиране на тези антиапоптотични протеини е описано и при други, немиеломни клетъчни линии под влияние на различни вещества и се медира от активирана каспаза-3. Установено е, че някои от получените фрагменти допълнително активират ефекторните каспази.

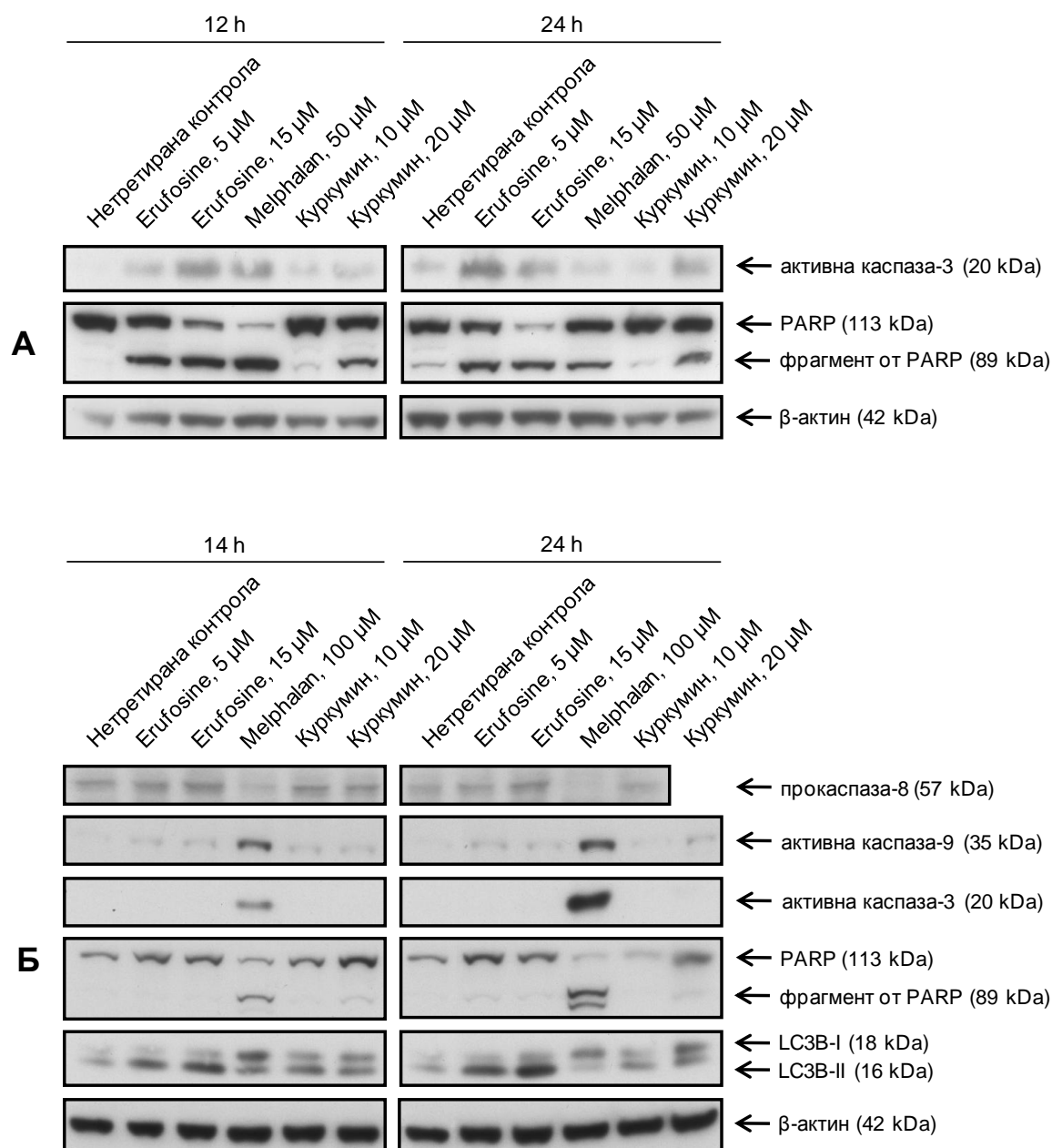
При нашите изследвания беше установено, че под действие на Erufosine в клетки RPMI-8226 се повишава нивото на липидно-свързаната форма на протеина LC3B (LC3B-II) – признак за стимулиране на автофагичния процес (фиг. 18). Не е изключено именно стимулирането на автофагията да е постулираният по-горе неапоптотичен механизъм, чрез който еруфозинът реализира цитотоксичния си ефект при клетки RPMI-8226 и U-266.

Представените в дисертацията опитни данни показват, че куркуминът, диарсеновият триоксид и мелфаланът също предизвикват апоптоза в миеломни клетки (фиг. 18).

5.2. Промени в сигнално-трансдукционните пътища

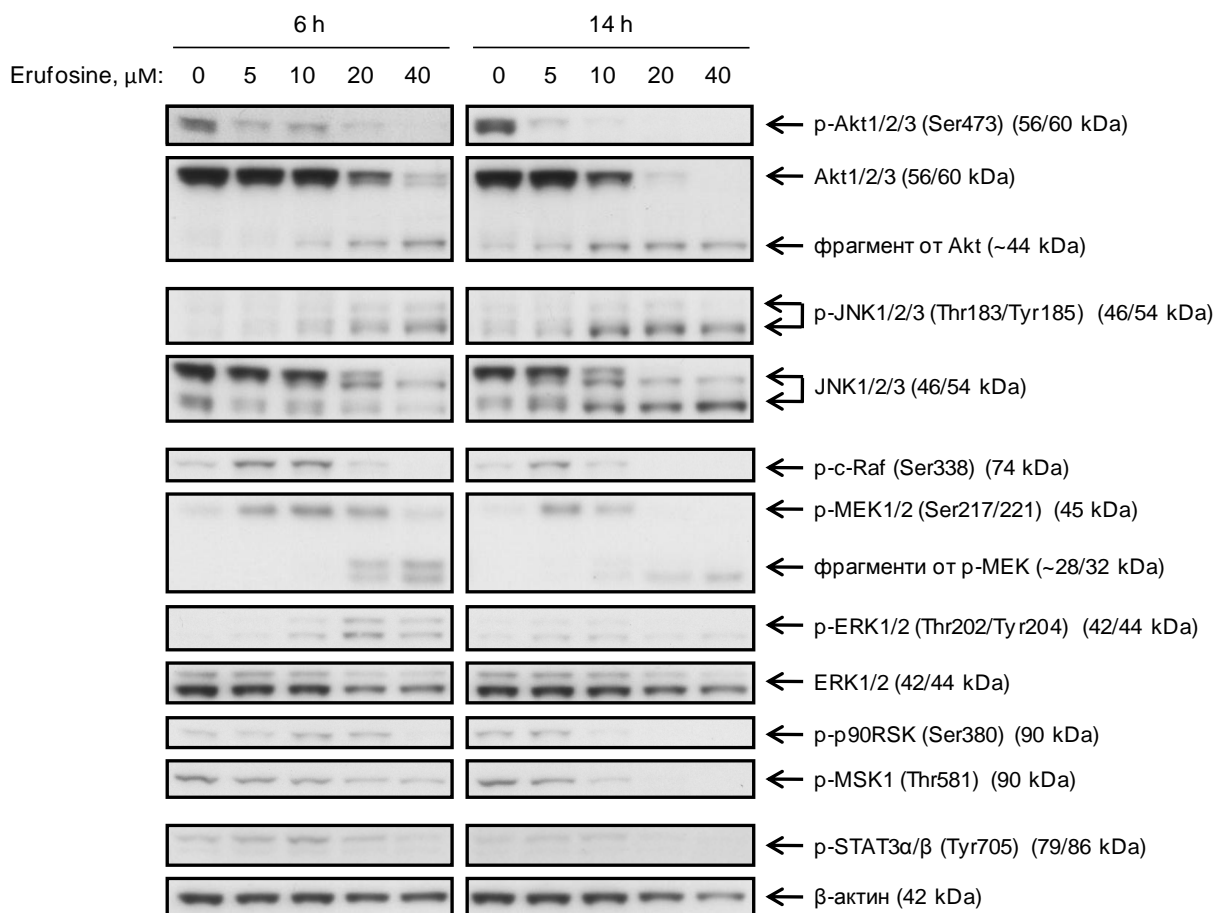
Получените резултати показват, че от трите изследвани миеломни клетъчни линии с най-висока степен на фосфорилиране на киназата Akt се характеризира U-266, а след нея се подреждат последователно RPMI-8226 и OPM-2. Еруфозинът предизвиква дефосфорилиране на p-Akt в клетки OPM-2 (фиг. 19), но не и в RPMI-8226 или U-266. Освен това при OPM-2 се наблюдава и разграждане на Akt с образуване на фрагмент с молекулна маса около 44 kDa, което може да се обясни с действието на активираните каспази. Има литературни данни, че фрагментирането на Akt ускорява апоптозата. Липсата на значително дефосфорилиране на p-Akt в клетки RPMI-8226 и U-266 подчертава важността на алтернативните молекулни мишени на АФХ.

Представените в дисертацията данни показват, че под действие на Erufosine настъпва фосфорилиране на JNK при клетки RPMI-8226 и OPM-2 (фиг. 19), но не и при U-266. Ефектът при RPMI-8226 е слаб и преходен във времето, докато при OPM-2 е силен и траен. Успоредно с това при OPM-2 се наблюдава разграждане на JNK, но въпреки това абсолютното ниво на фосфорилираната форма се покачва. Забелязва се корелация между способността на еруфозина да активира JNK в отделните миеломни клетъчни линии и задействането на апоптотична клетъчна смърт. Няма обаче зависимост между активирането на JNK и цитотоксичния ефект на алкилфосфохолина. Има публикувани подобни данни за Perifosine и други миеломни клетъчни линии.



Фиг. 18. Въздействие на различни вещества върху апоптотичните каскади в клетки OPM-2 (A) и RPMI-8226 (B), както и върху процеса на автофагия при клетки RPMI-8226 (B). Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.

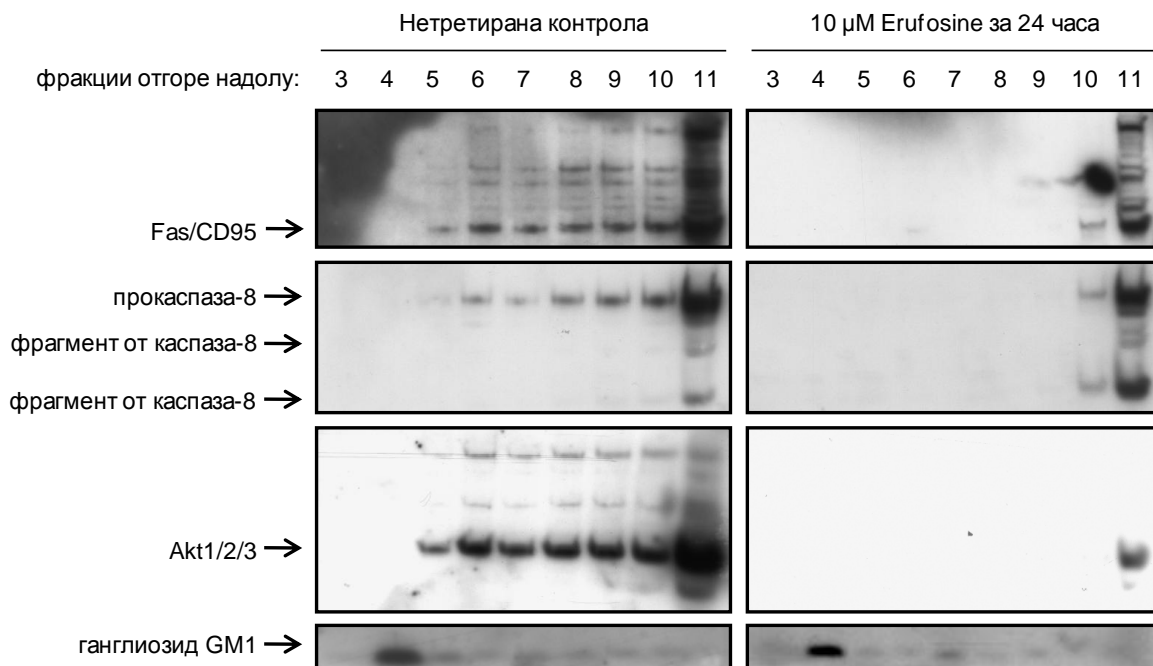
Нашите данни показват, че еруфозинът не оказва почти никакво влияние върху сигналния път c-Raf/MEK/ERK в клетки U-266 (наблюдава се слабо повишаване на нивото на активната форма на MEK, но това не води до промени в ERK и низшестоящия ефектор p90RSK). При OPM-2 (фиг. 19) и RPMI-8226 се наблюдава значително активиране на сигналния път c-Raf/MEK/ERK от сравнително ниски концентрации Erufosine. Най-напред се фосфорилира c-Raf, след което последователно и с известно закъснение се активират следващите кинази във веригата. При по-високи концентрации (над 20 μM) и по-дълго време на въздействие ефектът се обръща в противоположна посока, като при OPM-2 дори се наблюдава разграждане на MEK, вероятно под действие на активираните каспази.



Фиг. 19. Въздействие на Erufosine върху нивото и степента на фосфорилиране (съотв. степента на функционална активност) на ключови сигнални протеини в миеломни клетки OPM-2.

Получените данни показват, че еруфозинът оказва различно влияние върху сигналния път JAK/STAT при различните миеломни клетъчни линии. При OPM-2 не се наблюдават промени в нивото на p-STAT3 (фиг. 19), при U-266 нивото на p-STAT3 слабо се понижава, а при RPMI-8226 се повишава, но само при сравнително ниски концентрации на Erufosine, с максимум при 10 μM .

Липидните рафтове са микроучастъци от плазмената мембрана, които са богати на холестерол и сфинголипиди. Асоциирането и сливането на липидните рафтове може да доведе до концентриране в тях на определени протеини и да повлияе на функциите на тези протеини. Смята се, че така например се регулира активността на Fas/CD95. Нашите данни показват, че след въздействие с Erufosine настъпва сливане на липидните рафтове при миеломни клетки OPM-2, а в по-малка степен и при RPMI-8226. Понижава се количеството на каспаза-8, Fas/CD95 и Akt в липидните рафтове на клетки OPM-2 (фиг. 20), което контрастира с описаните ефекти на перифозина върху миеломната клетъчна линия MM144 – обогатяване на липидните рафтове с каспаза-8 и Fas/CD95. Тези различия показват колко малко се знае за променливите, влияещи върху взаимодействието на АФХ с липидните рафтове, както и за значението на процесите, протичащи в тези мембранни структури. Има данни, че в зависимост от типа на клетките разрушаването на липидните рафтове може да доведе или до активиране, или до инактивиране на Fas/CD95. Еруфозинът не разрушава



Фиг. 20. Влияние на Erufosine върху присъствието на Fas/CD95, прокаспаза-8 и Akt в ганглиозид GM1-съдържащите мембранны липидни рафтове при клетки OPM-2. След третиране, клетките са лизирани и подложени на ултрацентрифугиране в захарозен градиент. Отделени са 11 фракции, номерирани последователно в посока от върхната към дънната, които след това са анализирани чрез имуноблот за съдържание на въпросните протеини и на ганглиозид GM1.

липидните рафтове на клетки OPM-2, но тъй като „извежда“ Fas/CD95 и каспаза-8 от тези мембранны структури, той би могъл да улесни образуването на DISC (сигнален комплекс, индуциращ клетъчна смърт) в други области на плазмената мембрана, имащи по-ниско съдържание на холестерол (известно е, че холестеролът може да инхибира някои мембранны рецептори, напр. EGFR). Понижаването на съдържанието на Akt в липидните рафтове може също да е от значение за цитотоксичното действие на еруфозина, тъй като нормално фосфорилирането и активирането на Akt се извършва в плазмената мембрана.

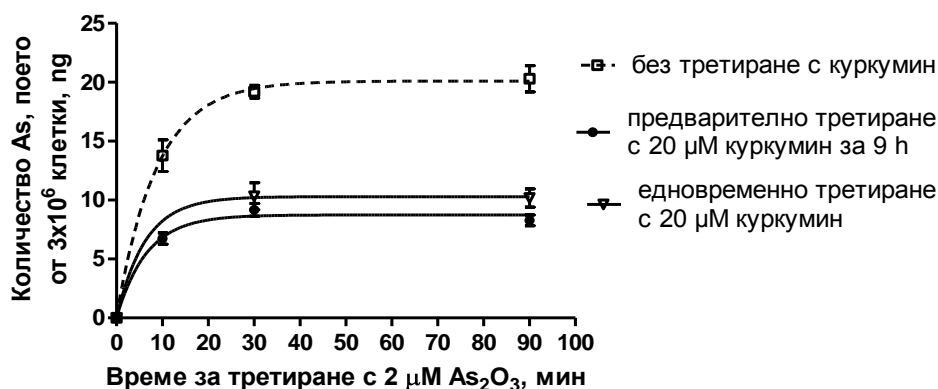
Независимо от дългата история на мелфалана в терапията на ММ, влиянието му върху основните сигнални пътища не е било целенасочено изследвано. Представените в дисертацията данни показват, че в клетки OPM-2 мелфаланът предизвиква фосфорилиране и активиране на JNK и ERK, както и дефосфорилиране и разграждане на p-Akt и p-MEK. Активирането на JNK и ERK би могло да се обясни с индуцирането на генотоксичен и оксидативен стрес. Разграждането на Akt и MEK вероятно се дължи на последващото активиране на каспазите. За разлика от OPM-2, при клетки RPMI-8226 не се наблюдава активиране на JNK след третиране с Melphalan. Това показва, че JNK вероятно не е от значение за способността на Melphalan да предизвиква апоптоза в МП.

Известно е, че куркуминът и бортезومیбът инхибират преминаването на NF- κ B в ядрото и така възпрепятстват транскрипцията на NF- κ B-зависимите гени. Нашите изследвания показват, че при дълго въздействие (48 h) куркуминът значително понижава общото количество на NF- κ B p65 в клетки U-266, докато бортезومیбът почти не оказва такъв ефект. Под действие на куркумина се наблюдава също инхибиране на Akt и понижаване на экс-

пресията на Bcl-2. Куркуминът повишава слабо степента на активация на ERK и низшестоящите кинази при клетки OPM-2 и RPMI-8226. При OPM-2 освен това се наблюдават лек спад в нивото на p-Akt и преходно покачване на p-JNK. Смята се, че едновременното активиране на ERK и инхибиране на Akt е свързано с индуциране на автофагична клетъчна смърт.

5.3. Изследвания върху взаимодействието между куркумин и As_2O_3 при клетки OPM-2

Представените в дисертацията резултати показват, че куркуминът потиска натрупването на As_2O_3 в клетки OPM-2. Наблюдаваното двукратно понижение на максимално постижимата вътреклетъчна концентрация на As_2O_3 (фиг. 21) би могло да обясни установения антагонизъм в цитотоксичните ефекти на куркумина и диарсеновия триоксид. Понижено натрупване на As_2O_3 се наблюдава и в случая, когато клетките са били предварително третирани с куркумин за определено време и едва след това са били изложени на As_2O_3 в среда, несъдържаща куркумин. Поради това може да се приеме, че не се касае за пряко химическо взаимодействие между двете вещества с образуване на комплекс, който трудно преминава през мембраната. Смята се, че основният път за навлизане на As_2O_3 в човешки клетки е чрез аквапорин-9. Може да се предположи, че куркуминът потиска функциите на аквапорин-9.



Фиг. 21. Влияние на куркумин върху скоростта и степента на натрупване на As_2O_3 в миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани с $20 \mu M$ куркумин по две различни схеми. В единия случай продължителността на третиране е 9 часа, след което клетките са промити с физиологичен разтвор, ресуспендирани в нова среда и третирани с As_2O_3 . В другия случай клетките са третирани с куркумин непосредствено преди добавянето на As_2O_3 в същата среда. И в двата случая са взети серии от проби във времето, в които количеството арсен проникнало в клетките е измерено чрез атомно-абсорбционна спектрометрия.

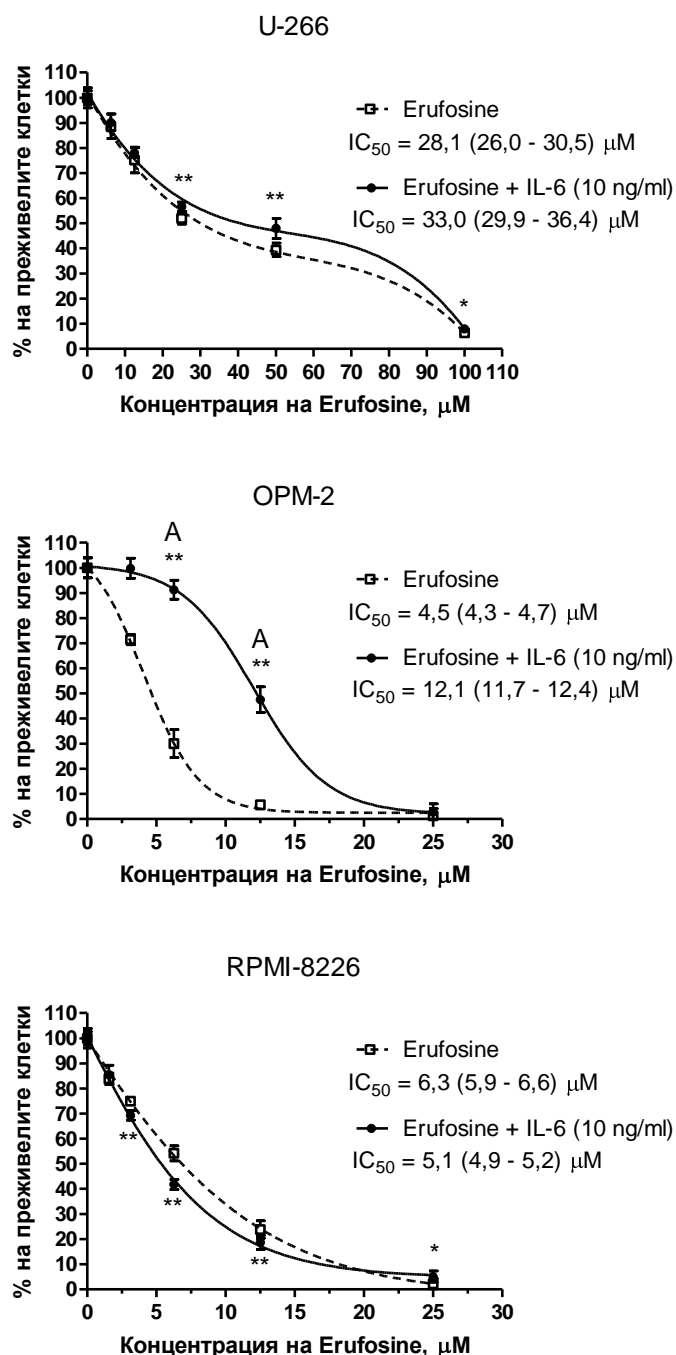
6. Влияние на различни фактори върху противомиеломния ефект на изследваните вещества

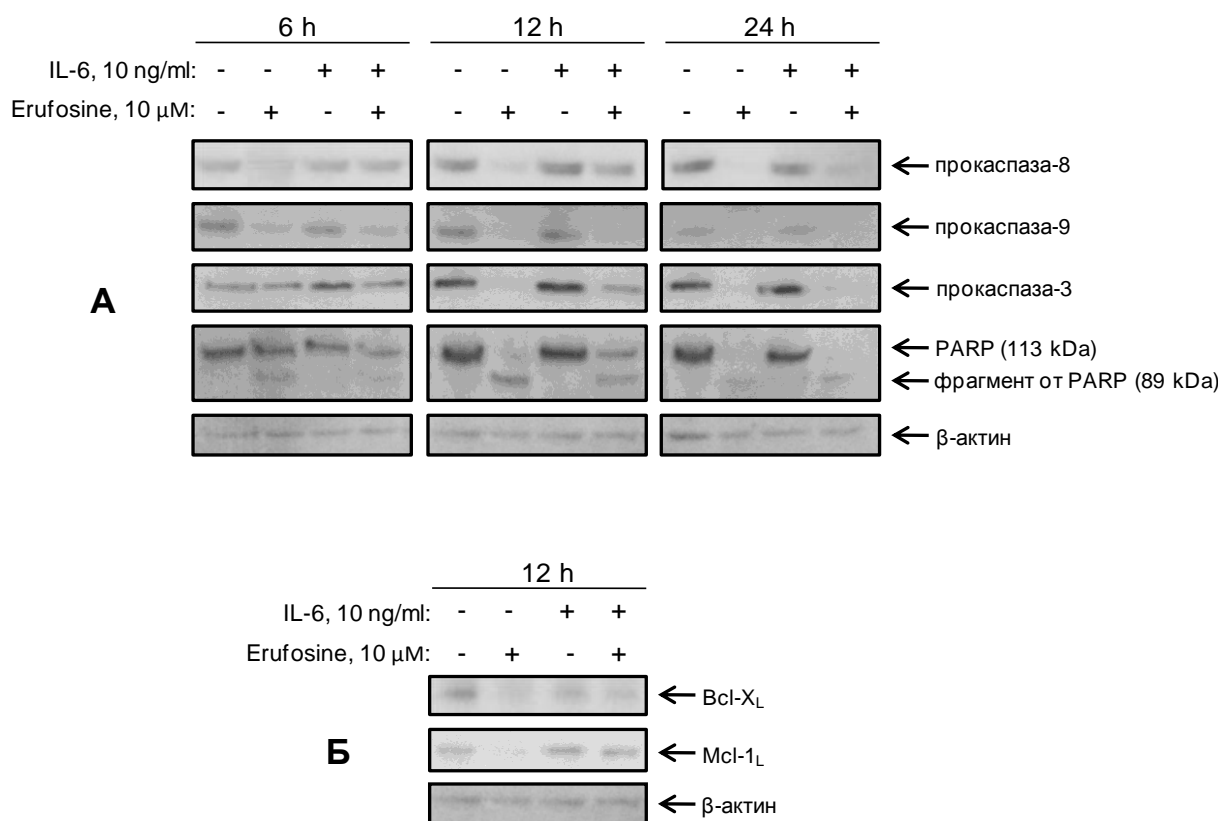
6.1. Влияние на интерлевкин-6 (IL-6)

Известно е, че IL-6 ускорява пролиферацията на миеломните клетки и им придава лекарствена резистентност. Стимулиране на пролиферацията беше наблюдавана и от нас при миеломните клетъчни линии OPM-2 и RPMI-8226. Отсъствието на стимулиращ ефект след прибавяне на IL-6 към клетки U-266 би могло да се обясни със съществуващата автокринна продукция на IL-6 от тези клетки.

Представените в дисертацията резултати показват, че ИЛ-6 има различен ефект върху чувствителността на различните миеломни клетъчни линии към Erufosine (фиг. 22). ИЛ-6 понижава цитотоксичността на еруфозина спрямо клетки U-266 и OPM-2, като във втория случай се наблюдава особено силно изразен антагонистичен ефект (трикратно понижаване на цитотоксичната ефективност). Точно обратното, чувствителността на клетки RPMI-8226 към еруфозин се повишава в присъствие на ИЛ-6. Данните ни показват, че антагонизмът при OPM-2 се дължи на инхибиране на способността на еруфозина да предизвиква апоптоза – затруднява се активирането на каспази-8, -9 и -3, фрагментирането на PARP и понижаването на експресията на Mcl-1 и Bcl-X_L (фиг. 23). Повишеният цитотоксичен ефект срещу RPMI-8226 няма задоволително обяснение. Може да се предположи, че едновременното въздействие с ИЛ-6 и еруфозин води до по-силно активиране на сигналния път MEK/ERK,

Фиг. 22. Влияние на ИЛ-6 върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml ИЛ-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с Erufosine контрола, приета за 100%. След нелинеен регресионен анализ са получени представените графики и IC₅₀-стойности с 95%-доверителни интервали. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана с ИЛ-6 проба. Една звездичка отговаря на P < 0,05, а две – на P < 0,01. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията ≥ 1,3 × преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Erufosine) е означено с буквата А.





Фиг. 23. Влияние на IL-6 върху способността на Erufosine да индуцира апоптоза при миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани само с Erufosine (10 μM), само с интерлевкин-6 (10 ng/ml) или едновременно с Erufosine и IL-6, за период от 6, 12 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Изследвани са активирането на апоптотичните каскади (А), както и нивата на антиапоптотичните протеини Bcl-X_L и Mcl-1_L (Б). Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.

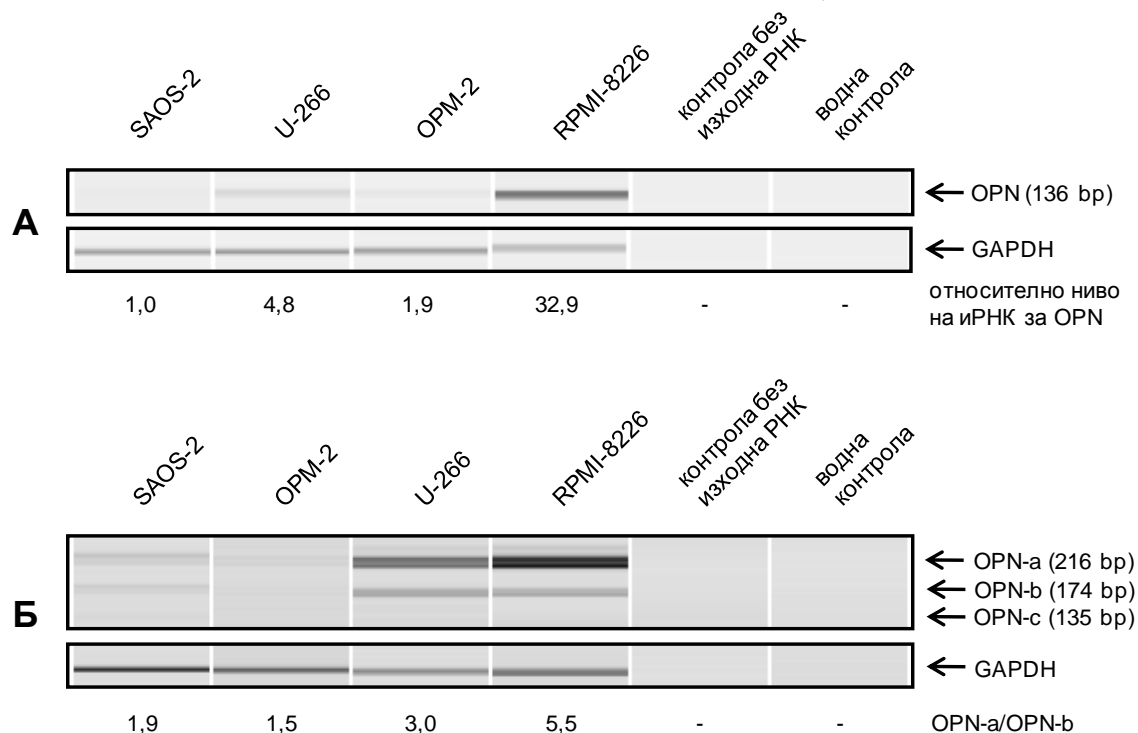
докато в същото време еруфозинът не позволява на IL-6 да активира сигналния път PI3K/Akt, с което биха се създали предпоставки за допълнително стимулиране на автофагичния процес.

Получените резултати показват също, че IL-6 понижава противомиеломната активност на куркумин, As₂O₃, Melphalan и Bendamustine и при трите използвани миеломни клетъчни линии. IL-6 понижава цитотоксичността на Vortezomib по отношение на клетки OPM-2 и RPMI-8226, но не и по отношение на U-266.

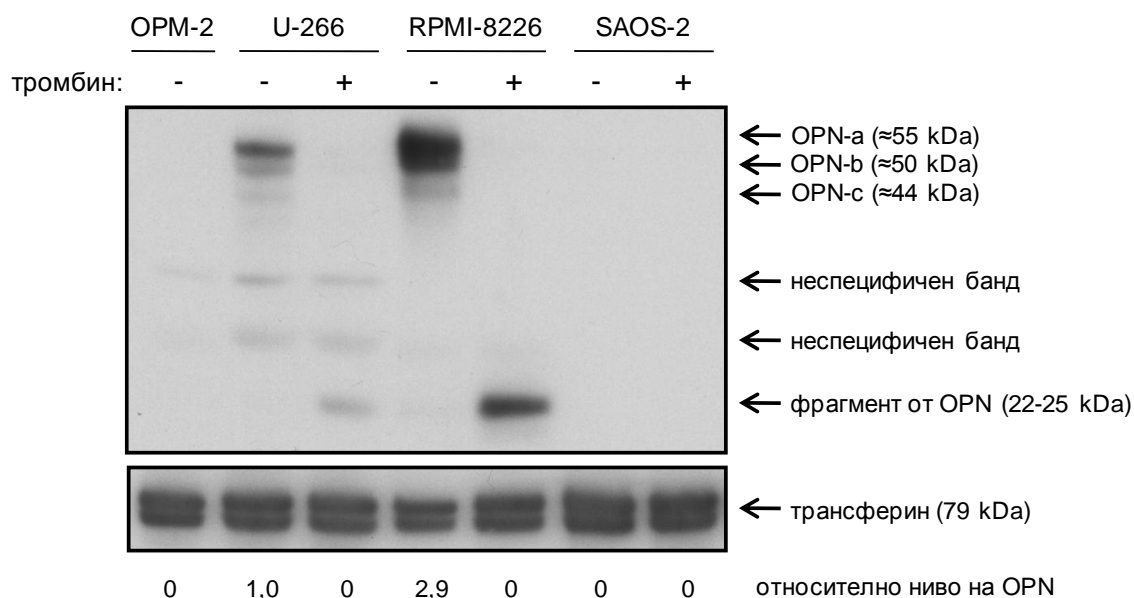
6.2. Влияние на остеоопонтин (OPN)

Остеопонтинът (OPN) е кисел фосфорилиран гликопротеин, който се синтезира от различни типове клетки и участва в множество физиологични и патологични процеси като адхезия, ангиогенеза, апоптоза, възпаление и метастазиране. Основният източник на OPN в костно-мозъчната микросреда са остеобластите. Остеопонтинът съставлява около 2% от неколагеновите белтъци в костите. Смята се, че OPN се кодира от един ген, но вследствие на алтернативен сплайсинг, фосфорилиране, гликозилиране и протеолитично разцепване се получават множество различни форми на протеина с молекулна маса варираща от 25 до

75 kDa. Установено е, че в част от случаите на ММ миеломните клетки синтезират и секретират OPN. Нашите резултати показват както на РНК-ниво (фиг. 24.А), така и на протеиново ниво (фиг. 25), че клетките RPMI-8226 синтезират и секретират голямо количество OPN, а U-266 – малко. Нивото на иРНК за синтез на OPN е още по-ниско в клетки OPM-2,



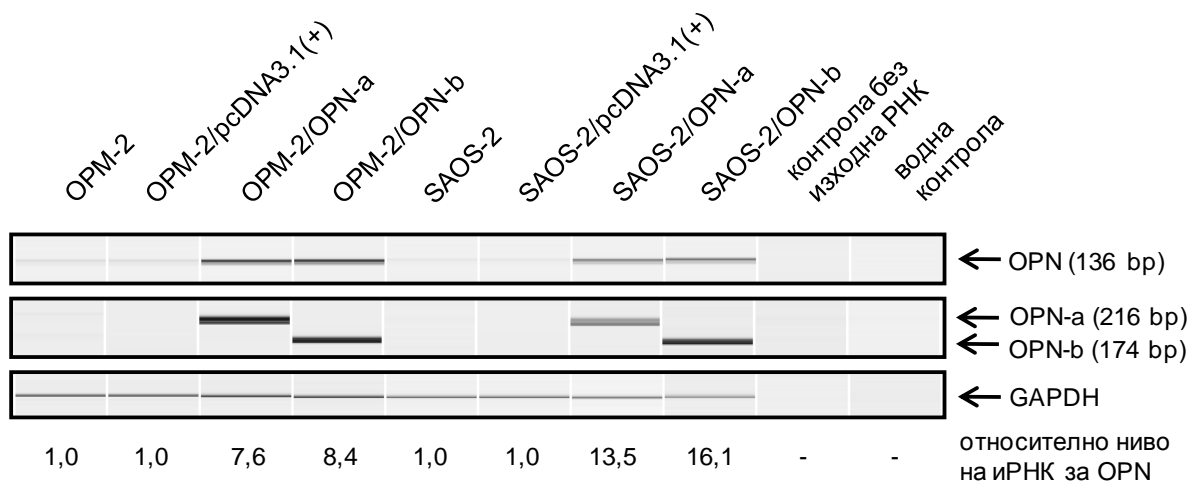
Фиг. 24. Сравнение чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на остеопонтин (OPN) в миеломните клетъчни линии OPM-2, U-266 и RPMI-8226 и в остеосаркомната SAOS-2.



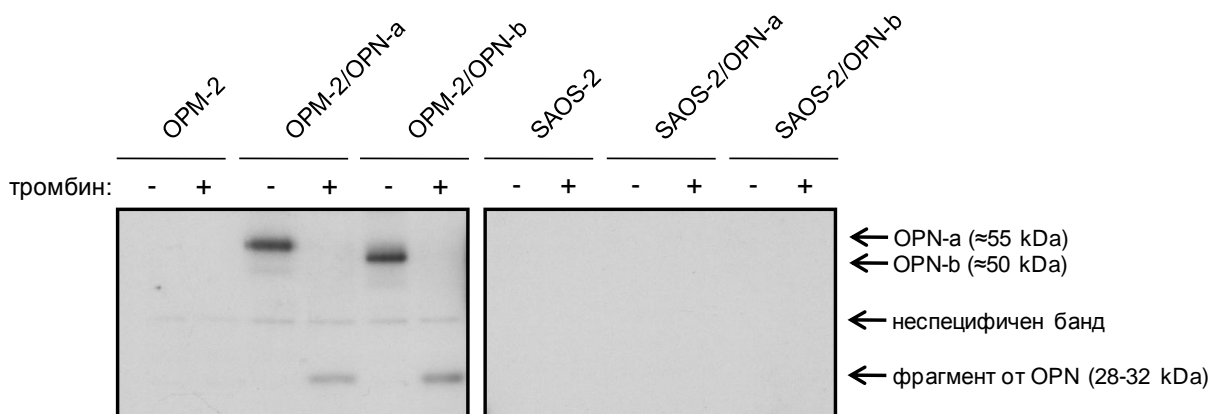
Фиг. 25. Сравнение на количествата остеопонтин (OPN), секретирани от клетки OPM-2, U-266, RPMI-8226 и SAOS-2 в хранителната им среда. Клетките са отглеждани в продължение на 3 дни в безсерумна среда Opti-MEM®, след което от средата е извлечен протеинов концентрат. Той е подложен на денатурация и е анализиран чрез имуноблот. Част от пробите са обработени с тромбин преди денатурирането, за да се наблюдава специфичното фрагментиране на остеопонтина.

като при тях не се установява секреция на протеина. Остеосаркомните клетки SAOS-2 имат още по-ниска експресия на OPN от OPM-2. Това може да се тълкува като белег за ниска степен на остеобластна диференциация. Данните ни показват, че всички изследвани клетъчни линии експресират предимно пълната форма OPN-a, а от изоформите, получени чрез алтернативен сплайсинг, преобладава OPN-b (липсващ пети екзон). На OPN-c (липсващ четвърти екзон) се пада минимален дял от общото количество OPN (фиг. 24.Б). Смята се, че OPN-b и OPN-c имат по-голяма разтворимост, обуславяща повишена способност да стимулират миграцията и метастазирането.

Публикувани изследвания показват, че OPN стимулира пролиферацията на миеломни клетки U-266. При нашите експерименти клетки OPM-2 и SAOS-2 бяха трансфектирани с линейаризирани плазмиди rOPN-a и rOPN-b, след което бяха селектирани производни клонове с трайно повишена експресия на OPN-a или OPN-b (фиг. 26 и 27). Не беше установе-

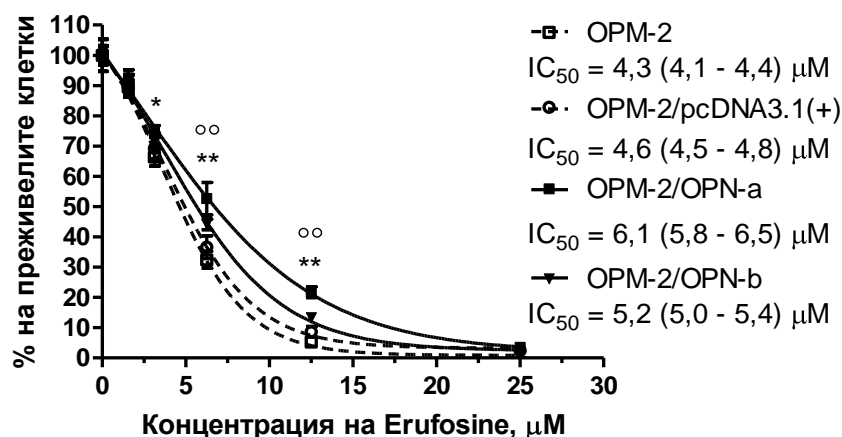


Фиг. 26. Сравнение чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на остеопонтин (OPN) в клетки OPM-2 и SAOS-2, както и в техни разновидности, получени след стабилна трансфекция с линейаризирани плазмиди. Използвани са празният плазмиден вектор pcDNATM3.1(+), както и плазмидите rOPN-a и rOPN-b, носещи съответно ген за OPN-a или OPN-b.



Фиг. 27. Проверка дали стабилно трансфектираните с rOPN-a или rOPN-b клетки OPM-2 и SAOS-2 секретират съответната изоформа на остеопонтин (съотв. OPN-a или OPN-b) в хранителната си среда. Протеинов концентрат от средата е подложен на денатурация и е анализиран чрез имуноблот. Аликвотни части от пробите са обработени с тромбин преди денатурирането, за да се наблюдава специфичното фрагментиране на остеопонтина.

но влияние на повишената експресия на OPN-a или OPN-b върху пролиферационната активност на клетките. Беше наблюдавано индуциране на резистентност към цитотоксичния ефект на Erufosine, по-силно изразено при повишена експресия на формата OPN-a (фиг. 28). Това би могло да се обясни с известната способност на OPN чрез свързване с рецептора CD44 да активира сигналния път PI3K/Akt и други кинази. Чувствителността на клетките към куркумин, As₂O₃ или мелфалан не беше повлияна съществено от повишената експресия на OPN-a или OPN-b.



Фиг. 28. Влияние на засилената ендогенна продукция на остеопонтин върху чувствителността на клетки OPN-2 към цитотоксичното действие на Erufosine. Сравнени са „стандартни“ клетки OPN-2 и техните стабилно трансфектирани производни OPN-2/pcDNA3.1(+), OPN-2/OPN-a и OPN-2/OPN-b. Преживяемостта на клетките е определена на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine. Наличието на статистически значими разлики спрямо резултатите за клетки OPN-2/pcDNA3.1(+) е обозначено със звездички (за OPN-2/OPN-a) или кръгчета (за OPN-2/OPN-b). Една звездичка (кръгче) отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

Афинитетът на стабилно трансфектираните производни на OPN-2 да адхерират към монослой от остеобластни клетки SAOS-2 не се различава съществено от този на изходните клетки OPN-2 (фиг. 13).

6.3. Влияние на фибронектин

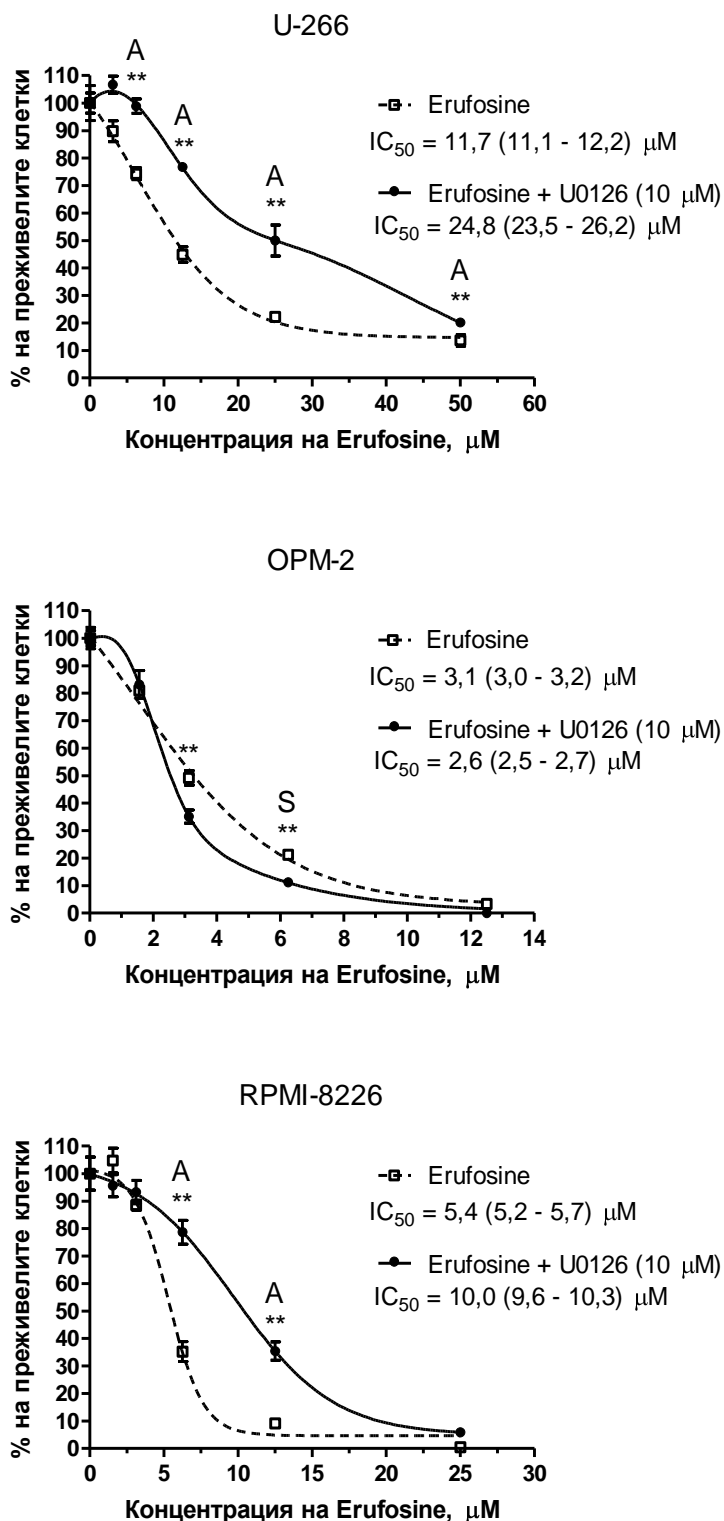
Знае се, че свързването на матриксния гликопротеин фибронектин със съответните клетъчни рецептори обуславя възникване на резистентност в клетки RPMI-8226 към цитотоксичното действие на Melphalan и Doxorubicin. Според получените от нас данни, фибронектинът не повлиява чувствителността на същата клетъчна линия към Erufosine, но индуцира резистентност към Erufosine при другите изследвани миеломни клетъчни линии – много слабо проявена при OPN-2 и по-силно при U-266.

6.4. Влияние на MEK1/2

U0126 е инхибитор на киназата MEK, който има собствен противомиеломен ефект и потенцира цитотоксичния ефект на Perifosine срещу клетки MM.1S и MM.1R. Нашите данни показват, че миеломните клетъчни линии U-266, OPN-2 и RPMI-8226 имат сходна чувствителност към U0126. При OPN-2 е налице синергизъм в действието на U0126 и Erufosi-

не, но U0126 понижава наполовина цитотоксичния ефект на еруфозина при клетки U-266 и RPMI-8226, т.е. в тези случаи се касае за подчертан антагонизъм (фиг. 29). Представените в дисертацията резултати показват, че U0126 повишава нивата на p-MEK в пробите, но това може да се обясни с факта, че инхибиторът се свързва именно с фосфорилираната форма на киназата и блокира действието ѝ. U0126 потиска ефективно активирането на ERK и низшестоящите кинази, включително в присъствие на еруфозин, но не оказва влияние върху Akt и JNK. Интересно е, че при клетъчната линия RPMI-8226 инхибирането на

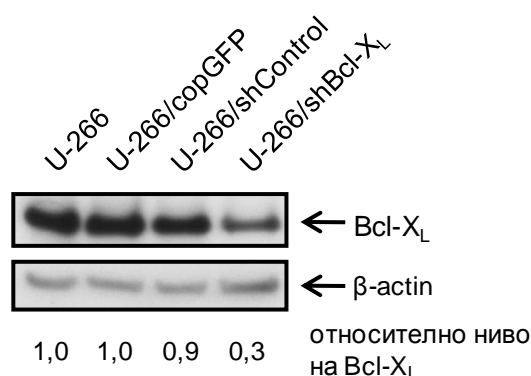
Фиг. 29. Влияние на U0126 (инхибитор на MEK1/2) върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 μM U0126. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с Erufosine контрола, приета за 100%. След нелинеен регресионен анализ са получени представените графики и IC_{50} -стойности с 95%-доверителни интервали. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значими разлики спрямо съответната нетретирана с U0126 проба ($P < 0,01$). Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Erufosine) е означено с буквата A. Наличието на синергизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\leq 0,7 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Erufosine) е означено с буквата S.



сигналния път MEK/ERK засилва иначе слабото активиране на апоптотичните каскади от Erufosine, но крайният резултат от взаимодействието е понижена цитотоксичност. Това още веднъж потвърждава тезата, че цитотоксичното действие на еруфозина срещу клетки RPMI-8226 протича по неапоптотични механизми. За разгръщането му е нужно активното участие на сигналния път MEK/ERK, което е косвен признак, че се осъществява чрез автофагична клетъчна смърт. Вероятно такъв е механизмът и при U-266. Нужни са допълнителни изследвания за доказване на тази хипотеза.

6.5. Влияние на Bcl-X_L

Известно е, че Bcl-X_L понижава чувствителността на лимфомни и глиомни клетки към АФХ-индуцирана апоптоза. При миеломни клетки MM144 също е наблюдавано понижаване на способността на Perifosine да индуцира апоптоза, след като в клетките е бил въведен плазмид, експресиращ Bcl-X_L. В рамките на дисертацията беше изследвано дали потискането на експресията на Bcl-X_L би могло да се използва за потенциране на противомиеломния ефект на еруфозина. Експериментите бяха проведени с клетъчната линия U-266, тъй като беше установено, че тя се характеризира със значителна експресия на Bcl-X_L и е най-резистентна към Erufosine. Нивото на Bcl-X_L в тези клетки беше трайно понижено чрез стабилна трансдукция с лентивируси, носещи ген за специфична интерферираща РНК (фиг. 30). Получените резултати не показват разлика между пролиферационната активност на клетките с понижено ниво на Bcl-X_L и клетките, трансфектирани с ген за контролна РНК-секвенция. Освен това потиснатата експресия на Bcl-X_L не повлиява чувствителността на клетките нито към Erufosine, нито към Melphalan. Нашите данни подкрепят полученото при други изследвания заключение, че инхибирането само на Bcl-X_L не е достатъчно, за да се потенцира противомиеломния ефект на различни вещества, и насочват към изследване на възможността резистентността към проапоптотичното действие на еруфозина да се преодолее чрез комбинирано инхибиране на различните антиапоптотични протеини.



Фиг. 30. Сравнение на степента на експресия на Bcl-X_L в клетки U-266 и в техни разновидности, получени след стабилна трансдукция с лентивирусни частици, носещи ген за интерферираща РНК насочена срещу иРНК за Bcl-X_L (shBcl-X_L), ген за зелено-флуоресциращия протеин copGFP или ген за контролна РНК-секвенция (shControl), която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК.

ИЗВОДИ

1. Erufosine проявява добре изразен цитотоксичен ефект срещу миеломни клетъчни линии и миеломни клетки, изолирани от пациенти. Изследваните вещества могат да се подредят в следния ред на нарастваща противомиеломна активност: бендамустин < мелфалан < куркумин < еруфозин < диарсенов триоксид < бортезомиб. Еруфозинът и куркуминът, от една страна, и клинично използваните лекарствени вещества (Melphalan, Bendamustine и Bortezomib), от друга, имат различаващ се спектър на активност по отношение на различните миеломни клетъчни линии, доказващ липса на кръстосана резистентност.

2. Erufosine не само не понижава клоногенността на нормалните човешки хемопоеични стволови клетки, а дори ги стимулира да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии.

3. Еруфозинът потиска миграционната активност на миеломната клетъчна линия RPMI-8226, без това да се дължи на прекия му цитотоксичен ефект.

4. Erufosine, Bendamustine, Melphalan и As_2O_3 потискат адхезията на миеломни клетки RPMI-8226 към остеопонтин. Еруфозинът и бендамустинът потискат и адхезията към фибронектин. Създаден е модел за изследване на адхезията на миеломни клетки към остеобласти, при който относителният брой на адхериралите миеломни клетки се определя чрез имуноблот с антияло срещу протеина Vcl-2. Създаден е оригинален модел за *in vitro* изследване на инвазивните свойства на миеломните клетки, при който миеломните клетки се отглеждат заедно със сфероиди от остеобласти във въртящ се биореактор и навлизането им сред тях се установява имунохистохимично, с антияло срещу Vcl-2.

5. Комбинациите на еруфозин или куркумин с бендамустин, мелфалан или бортезомиб могат да се окачат като синергистични (суперадитивни) по отношение на постигания противомиеломен цитотоксичен ефект. Комбинациите на As_2O_3 с бендамустин, мелфалан или бортезомиб, както и на бортезомиб с мелфалан или бендамустин, могат да се определят като адитивни. Комбинациите на еруфозин с куркумин или As_2O_3 , както и на куркумин с As_2O_3 , могат да се окачат като антагонистични. Куркуминът потиска натрупването на As_2O_3 в клетки OPM-2, което е вероятна причина за наблюдавания антагонизъм при съвместно приложение на двете вещества.

6. Еруфозинът е способен да предизвиква различен тип клетъчна смърт чрез активиране на апоптотични и неапоптотични механизми:

6.1. В клетките с ниска експресия на антиапоптотични протеини еруфозинът предизвиква сливане на мембранните липидни рафтове и променя съдържанието им на Akt, Fas/CD95 и прокаспаза-8, инхибира сигналния път PI3K/Akt, повишава активността на стресовата киназа JNK и предизвиква активиране на външния и на вътрешния път на апоптозата.

6.2. При клетките с висока експресия на антиапоптотични протеини от основно значение за цитотоксичния ефект на еруфозина е високата активност на сигналния път c-Raf/MEK/ERK, което е косвен признак, че еруфозинът предизвиква автофагична клетъчна смърт в тези клетки. Противомиеломната му ефективност може да е висока дори в случаите, когато не предизвиква апоптоза, както се демонстрира от сходните резултати при клетки OPM-2 (апоптотичен механизъм) и RPMI-8226 (неапоптотичен механизъм).

7. Потвърдена е способността на куркумин, диарсенов триоксид и мелфалан да предизвикват апоптоза в миеломни клетки. Потвърдено е потискането от куркумина на транскрипционния фактор NF- κ B и някои регулирани от него гени и са получени данни за стимулиране на автофагичния процес. Мелфаланът активира JNK при някои миеломни клетъчни линии, но това не изглежда определящо за способността му да индуцира апоптоза.

8. Интерлевкин-6 понижава противомиеломната активност на всички изследвани вещества спрямо трите използвани клетъчни линии. Особен случай е клетъчната линия RPMI-8226, чиято чувствителност към еруфозин се повишава. При клетки OPM-2 остеопонтинът (OPN-a или OPN-b) индуцира резистентност към Erufosine, но не и към куркумин, As₂O₃ или мелфалан. Фибронектинът индуцира резистентност към Erufosine само при някои миеломни клетъчни линии (напр. при U-266 и OPM-2, но не и при RPMI-8226). Повишената активност на сигналния път c-Raf/MEK/ERK е от съществено значение за осъществяване на цитотоксичния ефект на Erufosine срещу миеломни клетки U-266 и RPMI-8226, но затруднява същия по отношение на клетки OPM-2. Потискането на експресията на Bcl-X_L при миеломни клетки U-266 не потенцира цитотоксичните ефекти на еруфозина и мелфалана.

Може да се обобщи, че алкилфосфохолиновият аналог Erufosine е перспективно съединение, съчетаващо комплексна противомиеломна активност и липса на миелотоксичност. Проучени са аспекти от механизма му на действие и фактори, влияещи върху ефективността му. Получените резултати дават основание да се счита, че еруфозинът и куркуминът имат достатъчно потенциал, за да бъдат проведени клинични проучвания с тях при пациенти с мултиплен миелом. Особено обещаващо изглежда комбинирането на Erufosine и куркумин с утвърдени в практиката лекарства като алкилиращите цитостатици Melphalan и Bendamustine и протеазомния инхибитор Bortezomib.

Приноси

Методични приноси

1. Създаден и валидиран е метод за изследване на адхезията на миеломни клетки към остеобласти.
2. Разработен е оригинален модел за *in vitro* изследване на инвазивните свойства на миеломни клетки, при който миеломните клетки се отглеждат заедно със сфероиди от остеобласти във въртящ се биореактор и навлизането им сред тях се установява имунохистохимично с антитяло срещу Bcl-2.

Научно-приложни приноси

1. За първи път е установена противомиеломната активност на Erufosine, което представлява научно-приложен принос, свързан със създаване на ново средство за лечение на мултиплен миелом (ММ). Сравнителното изследване показва следния ред на нарастваща противотуморна активност: бендамустин < мелфалан < куркумин < еруфозин < диарсенов

триоксид < бортезомиб. Установени са данни за липсваща кръстосана резистентност с други цитостатици.

2. Потвърдена е липсата на хематологична токсичност на Erufosine и е доказано неговото стимулиращо действие върху нормални човешки хемопоетични прекурсори.

3. За първи път са установени данни за антимиграционна активност на Erufosine спрямо миеломни клетки, без това да е във връзка с прекия цитотоксичен ефект.

4. Установени са нови факти относно противомиеломното действие на Erufosine, Bendamustine, Melphalan и As_2O_3 , а именно антиадхезионен ефект спрямо остеопонтин, а в някои случаи (Erufosine и Bendamustine) и спрямо фибронектин.

5. Установени са синергистични комбинации с противомиеломен ефект: еруфозин + бендамустин; еруфозин + мелфалан; еруфозин + бортезомиб; куркумин + бендамустин; куркумин + мелфалан; куркумин + бортезомиб.

6. Налице е научен принос по отношение на изясняване на механизма на противомиеломно действие на Erufosine. Установено е индуциране на различен тип клетъчна смърт при различните миеломни клетъчни линии – апоптотична или неапоптотична (вероятно автофагична). В първия случай (при клетките с ниска експресия на антиапоптотични протеини) е установено сливане на мембранните липидни рафтове и промяна в съдържанието им на Akt, Fas/CD95 и прокаспаза-8, инхибиране на сигналния път PI3K/Akt, повишаване на активността на стресовата киназа JNK и активиране на външния и на вътрешния път на апоптозата. Във втория случай (при клетките с висока експресия на антиапоптотични протеини) е установено, че от основно значение за цитотоксичния ефект на еруфозина е високата активност на сигналния път c-Raf/MEK/ERK, което е косвен признак, че еруфозинът предизвиква автофагична клетъчна смърт в тези клетки.

7. За първи път са изследвани: влиянието на IL-6 върху противомиеломната активност на Erufosine и Bendamustine; влиянието на OPN върху противомиеломната активност на Erufosine, куркумин, As_2O_3 и Melphalan; влиянието на фибронектин върху противомиеломната активност на Erufosine. Установена е хетерогенност между отделните миеломни клетъчни линии по отношение на влиянието на сигналния път c-Raf/MEK/ERK върху чувствителността им към Erufosine.

Приноси с потвърдителен характер

1. Получените данни относно противомиеломната активност на куркумина, диарсеновия триоксид и мелфалана имат потвърдителен характер.

2. Потвърдена е способността на IL-6 да индуцира резистентност в миеломни клетки към Melphalan.

Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Д. Йосифов, П. Ганева, С. Константинов (2008). „Новости в лекарственото лечение на мултипления миелом.“ Клинична и трансфузионна хематология XLIII(1-2): 20-35.

2. D.Y. Yosifov, S.M. Konstantinov, M.R. Berger (2009). "Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (Erufosine) Shows Substantial Cytotoxicity in Multiple Myeloma Cells." Annals of the New York Academy of Sciences **1171**: 350-358. (IF 2009 = 2,67)

3. D.Y. Yosifov, P.T. Todorov, M.M. Zaharieva, K.D. Georgiev, B.A. Pilicheva, S.M. Konstantinov, M.R. Berger (2011). "Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potential antimyeloma drug devoid of myelotoxicity." Cancer Chemotherapy and Pharmacology **67**(1): 13-25. (IF 2009 = 2,654)

Справка за цитиранията на публикациите

Публикация 2. е цитирана от Rudner, J., C. Ruiner, R. Handrick, H. Eibl, C. Belka, V. Jendrosseck (2010). "The Akt-inhibitor Erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation." Radiation oncology **5**: 108. (IF 2009 = 2,53).

Публикация 3. е цитирана от Bagley R.G., L. Kurtzberg, C. Rouleau, M. Yao, B.A. Teicher (2011). "Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells." Cancer Chemotherapy and Pharmacology DOI 10.1007/s00280-011-1658-0. (IF 2009 = 2,654)

Участия в научни форуми във връзка с дисертационния труд

1. D. Yosifov, S. Konstantinov (2007) „Erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (ErPC3) and curcumin as signal transduction modifiers in multiple myeloma cells and establishment of an in vitro model of bone destruction." 5th International Symposium on Targeted Anti-cancer Therapies, 08-10.03.2007, Amsterdam, Netherlands. Annals of Oncology **18**, Supplement 4: iv34.

2. D. Yosifov, S. Konstantinov (2007). "Curcumin and erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (ErPC3) as promising partners in combined antimyeloma treatment and establishment of an in vitro model of bone destruction." 6th International Congress of Medical Sciences, 10-13.05.2007, Sofia, Bulgaria. Tribuna Medica **LIX**(1), Supplement: 71.

3. D. Yosifov, S. Konstantinov, M. Berger (2008). "Apoptosis induction in multiple myeloma cells by the new synthetic alkylphosphocholine erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium (erufosine)." Apoptosis World 2008 – From mechanisms to applications, 23-26.01.2008, Luxembourg. Proceedings and Program: 282.

4. D. Yosifov, M. Zaharieva, P. Todorov, S. Konstantinov, M.R. Berger (2009). "Antineoplastic activity of erufosine and riproximin in Multiple Myeloma cells." 15th International AEK Cancer Congress, 18-20.03.2009, Berlin, Germany. Congress Program and Abstracts: 90.

5. D.Y. Yosifov, P.T. Todorov., S.M. Konstantinov, M.R. Berger (2010). "The alkylphosphocholine erufosine is a potential antimyeloma drug." VI Национален конгрес по фармакология, 01-04.10.2009, Златни пясъци, България. Autonomic & Autacoid Pharmacology **30**: 63.

6. D. Yosifov, S. Konstantinov, M. Berger (2010). "IL-6 induces resistance to the prospective antimyeloma drug erufosine in some multiple myeloma cell lines." 29. Deutscher Krebskongress, 24-27.02.2010, Berlin, Germany. Onkologie **33**, Supplement 2: 158.