



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
мултиплиения миелом

Д и с е р т а ц и я

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

София, 2011

Съдържание

Използвани съкращения.....	9
Увод.....	13
I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	14
1. Мултиплен миелом – биологични особености и нови терапевтични стратегии	14
1.1. Обща характеристика	14
1.2. Биология и патофизиология на мултипления миелом.....	15
1.2.1. Генетична характеристика	15
1.2.2. Взаимодействия между миеломните клетки и костно-мозъчната микросреда	17
1.2.3. Патогенеза на други усложнения при мултиплен миелом	23
1.3. Стадиране на мултипления миелом	24
1.4. Класическа химиотерапия на мултипления миелом.....	25
1.5. Трансплантация на хемопоетични стволови клетки.....	26
1.6. Нови фармакологични средства за лечение на мултиплен миелом	27
1.6.1. Производни на талидомида	27
1.6.2. Протеазомни инхибитори	34
1.6.3. Нови алкилатори	39
1.6.4. Средства, инхибиращи функциите на растежни фактори или на рецептори за растежни фактори	39
1.6.5. Фарнезилтрансферазни инхибитори	41
1.6.6. Хистон-деацетилазни инхибитори.....	42
1.6.7. Инхибитори на Hsp90	43
1.6.8. Алкилфосфохолини, куркумин и арсенови производни.....	43
1.6.9. Други	44
1.7. Заключение	47
2. Алкилфосфохолини.....	48
2.1. История.....	48
2.2. Химична структура и класификация.....	49
2.3. Връзка структура-действие	50
2.4. Фармакокинетика	51
2.5. Механизъм на действие.....	53
2.5.1. Инхибиране на биосинтеза на фосфатидилхолин.....	53
2.5.2. Повлияване на сигналния път Ras/Raf/MEK/ERK	55
2.5.3. Инхибиране на сигналния път PI3K/Akt.....	56
2.5.4. Активиране на JNK.....	56
2.5.5. Лиганд-независимо активиране на Fas/CD95	58
2.5.6. Инхибиране на Ca ²⁺ -зависимата АТФ-аза	58
2.5.7. Непреки механизми	59
2.6. Предклинични данни за фармакологичните ефекти	59
2.7. Данни от клинични проучвания	61
2.8. Фармакологичен профил на безопасност	62
2.9. Рационални комбинации с други лекарства	63
2.10. Обобщение и бъдещи насоки	64

3. Куркумин.....	65
3.1. Добиване и физикохимични свойства	65
3.2. Фармакокинетика	66
3.3. Механизъм на действие.....	66
3.3.1. Пряко взаимодействие с различни мишени	67
3.3.2. Потискане на активността на различни транскрипционни фактори	67
3.3.3. Промени в протеиновата експресия.....	67
3.3.4. Модулиране на активността на редица кинази.....	68
3.3.5. Промени в окислително-редукционния баланс	68
3.3.6. Индуциране на апоптоза	69
3.3.7. Индуциране на автофагична клетъчна смърт	69
3.3.8. Други механизми	69
3.4. Предклинични данни за фармакологичните ефекти	70
3.5. Данни от клинични проучвания	72
3.6. Фармакологичен профил на безопасност	73
3.7. Рационални комбинации с лекарства.....	74
3.8. Обобщение и бъдещи насоки	75
4. Диарсенов триоксид	76
4.1. История.....	76
4.2. Фармакокинетика	76
4.3. Механизъм на действие.....	77
4.3.1. Индуциране на оксидативен стрес	77
4.3.2. Повлияване на различни сигнални пътища	78
4.3.3. Повлияване на различни транскрипционни фактори	78
4.3.4. Специфични механизми в определени видове клетки.....	80
4.4. Предклинични данни за фармакологичните ефекти	80
4.5. Данни от клинични проучвания	81
4.6. Фармакологичен профил на безопасност	82
4.7. Рационални комбинации с други лекарства	83
4.8. Обобщение и бъдещи насоки	84
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	85
1. Цел	85
2. Задачи	85
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	87
1. Материали	87
1.1. Вещества, прилагани върху миеломните клетки	87
1.1.1. Вещества, изследвани за противомиеломно действие	87
1.1.2. Лекарствени вещества, регистрирани за приложение при ММ	88
1.1.3. Биологични макромолекули	89
1.1.4. Инхибитори на сигналната трансдукция	90
1.2. Клетъчни линии	90
1.3. Кръв от умбиликална вена.....	92
1.4. Генетичен материал, използван при провеждане на трансфекционни експерименти	93
1.5. Други.....	95
2. Методи.....	96
2.1. Култивиране на туморни клетки	96

2.1.1. Приготвяне на хранителна среда	96
2.1.2. Размразяване на криоконсервирани клетки	96
2.1.3. Поддържане на клетките в експоненциална фаза на растеж	97
2.1.4. Криоконсервиране на клетки	98
2.1.5. Култивиране в обща среда на физически разделени едни от други миеломни клетки U-266 и остеобластни SAOS-2	99
2.1.6. Триизмерно клетъчно култивиране във въртящи се биореактори	99
2.2. Изолиране на мононуклеарни клетки чрез градиентно центрофугиране	100
2.3. МТТ-метод за оценяване на виталността и пролиферативната активност на клетъчните култури	101
2.4. Оценяване на клоногенността на хемопоеични прогенитори, изолирани от умбиликална кръв	106
2.5. Оценяване на миграционната активност на миеломни клетки	107
2.6. Оценяване на адхезионната способност на миеломни клетки	109
2.6.1. Адхезия към адсорбирани адхезионни молекули	109
2.6.2. Адхезия към монослой от остеобластни клетки SAOS-2	112
2.7. Имуноблот (Western blot)	114
2.7.1. Изолиране и замразяване на проби от клетки	114
2.7.2. Лизиране и денатуриране на клетъчните проби	114
2.7.3. Приготвяне и концентриране на проби от кондиционирана среда	115
2.7.4. Определяне на белтъчната концентрация на пробите	116
2.7.5. Обработване и денатуриране на концентрираните проби от кондиционирана среда и на стандартен остеопонтинов разтвор	119
2.7.6. Електрофореза в полиакриламиден гел при денатуриращи условия	119
2.7.7. Електротрансфер на протеините от гела върху PVDF-мембрана	120
2.7.8. Имунологична обработка на мембраните	121
2.7.9. Визуализиране на комплексите антиген-антитяло	122
2.7.10. Отстраняване на антителата от мембраните (стрипиране)	123
2.8. Имунохистохимия	124
2.9. Приготвяне на микроскопски препарати от конвенционални клетъчни култури	124
2.10. Поточна цитометрия	125
2.11. Електрофоретичен анализ на ДНК, изолирана от клетки	126
2.11.1. Изолиране на цитозолна ДНК	127
2.11.2. Изолиране на ДНК от ядра на миеломни клетки, инкубирани с цитозол от третирани клетки SKW-3 (KE-37)	128
2.11.3. Електрофореза на ДНК в агарозен гел	130
2.12. Изолиране на клетъчни фракции, съдържащи мембранни липидни рафтове	130
2.13. Изследване на вътреклетъчното натрупване на As ₂ O ₃	132
2.14. Полимеразна верижна реакция след обратна транскрипция (RT-PCR)	134
2.14.1. Изолиране и замразяване на проби от клетки	134
2.14.2. Изолиране на тотална РНК	134
2.14.3. Пречистване на изолираната РНК от замърсяваща я ДНК	135
2.14.4. Обратна транскрипция на иРНК до кДНК	136
2.14.5. Полимеразна верижна реакция (PCR)	137
2.14.6. Капилярна електрофореза на продуктите от RT-PCR	139
2.15. Размножаване на плазмиди	141
2.15.1. Трансформация на химиокомпетентни <i>E. coli</i>	141
2.15.2. Размножаване на успешно трансформирани <i>E. coli</i>	142
2.15.3. Изолиране и пречистване на плазмидите	142
2.16. Линеаризиране на плазмиди	144

2.16.1. Провеждане на рестрикцията	144
2.16.2. Пречистване на линеаризирани плаزمиди	145
2.16.3. Електрофоретичен анализ на линеаризирани плазмиди	145
2.17. Въвеждане на чужд генетичен материал в еукариотни клетки.....	146
2.17.1. Трансфекция с помощта на Lipofectamine™ 2000	147
2.17.2. Трансфекция с помощта на TurboFect™	148
2.17.3. Селекция на стабилно трансфектирани клетки	149
2.17.4. Трансдукция и последваща селекция на клетки, трайно експресиращи трансдуцираните гени.....	150
IV. РЕЗУЛТАТИ	153
1. Клетъчни ефекти на изследваните вещества и комбинации от вещества.....	153
1.1. Цитотоксични ефекти	153
1.1.1. Самостоятелни цитотоксични ефекти на отделните вещества	153
1.1.2. Комбинационни цитотоксични ефекти при едновременно приложение на две вещества	162
1.2. Антимиграционен ефект на еруфозина	184
1.3. Инхибиране на адхезионната способност.....	188
1.3.1. Инхибиране на адхезията към адсорбирани адхезионни молекули	188
1.3.2. Разработване на модел за изучаване на адхезията на миеломни клетки към остеобластни клетки SAOS-2	192
1.4. Разработване на <i>in vitro</i> модел за изучаване на костната инвазия на миеломните клетки	194
2. Механизъм на действие на изследваните вещества	196
2.1. Индуциране на апоптоза.....	196
2.1.1. Промени в морфологията на клетъчните ядра.....	196
2.1.2. Нарастване на процентния дял на суб-G1-фракцията (частта от клетки със съдържание на ДНК по-малко от характерното за фаза G1)	196
2.1.3. Олигонуклеозомна ДНК-фрагментация	199
2.1.4. Активиране на апоптотичните каскади	204
2.2. Промени в сигнално-трансдукционните пътища.....	211
2.3. Въздействие върху мембранните липидни рафтове	225
2.4. Изследвания върху взаимодействието между куркумин и As ₂ O ₃ при клетки OPM-2.....	227
3. Влияние на различни извънклетъчни и вътреклетъчни фактори върху противомиеломния ефект на изследваните вещества.....	231
3.1. Влияние на интерлевкин-6 (IL-6)	231
3.2. Влияние на остеопонтин (OPN).....	255
3.2.1. Влияние на добавен рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN)	256
3.2.2. Влияние на потиснатата или стимулирана продукция на остеопонтин от клетките	259
3.3. Влияние на кондиционирана среда от клетки SAOS-2	269
3.4. Влияние на фибронектин	274
3.5. Влияние на MEK1/2.....	274
3.6. Влияние на Vcl-X _L	280
V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ.....	285
1. Сравнителен анализ на противомиеломната активност на изследваните вещества	285
2. Рационални комбинации от вещества с противомиеломна активност	289
3. Разработване на <i>in vitro</i> модели за изследване на взаимодействието между миеломни клетки и остеобласти	292

4. Механизъм на действие на изследваните вещества	294
5. Влияние на различни фактори върху противомиеломния ефект на изследваните вещества	302
VI. ИЗВОДИ	308
VII. БИБЛИОГРАФИЯ.....	311
VIII. Приложение I.....	326
1. Апаратура и консумативи, използвани при работа с клетъчни култури	326
1.1. Основна апаратура и консумативи	326
1.2. За изолиране на моноклеарни клетки от кръв или костен мозък	327
1.3. За пространствено разделяне на миеломни клетки U-266 и остеобластни SAOS-2 при съвместното им култивиране в обща среда	327
1.4. За триизмерно клетъчно култивиране	328
2. Апаратура и вещества, използвани при изследване на физиологични параметри на клетките ...	328
2.1. За оценка на виталността на клетките по МТТ-метода на Mosmann	328
2.2. За оценка на миграционната активност на клетките	328
2.3. За оценка на адхезионната способност на клетките	329
3. Апаратура и вещества, използвани при изготвяне и анализ на микроскопски препарати	329
4. Апаратура и консумативи, използвани при имуноблот	329
4.1. За лизиране на пробите	329
4.2. За концентриране на кондиционирани среди и специфично разцепване на наличния в тях остеопонтин	330
4.3. За определяне на белтъчната концентрация	331
4.4. За определяне на молекулната маса на протеините	332
4.5. За провеждане на електрофореза в полиакриламиден гел	332
4.6. За напречния електротрансфер	333
4.7. За имунологичната обработка на мембраните:	334
4.8. За визуализиране на комплексите антиген-антитяло	337
4.9. За отстраняване на антителата от мембраните (стрипиране)	337
5. Апаратура и вещества, използвани при изследване на клетъчното ДНК-съдържание по поточно-цитометричния метод на Nicoletti	338
6. Апаратура и консумативи, използвани за установяване на олигонуклеозомна ДНК-фрагментация	338
6.1. За изолиране на ДНК от цитозола на клетките	338
6.2. За изолиране на ДНК от ядра на миеломни клетки, които са били инкубирани с цитозол от клетки SKW-3	339
6.3. За провеждане на ДНК-електрофореза в агарозен гел.....	339
7. Апаратура и консумативи, използвани за изолиране на лизатни фракции, съдържащи мембранни липидни рафтове	340
8. Апаратура и консумативи, използвани при анализ на вътреклетъчното натрупване на арсен	341
9. Апаратура и консумативи, използвани при RT-PCR	341
9.1. За изолиране на тотална РНК и измерване на концентрацията ѝ	341
9.2. За пречистване на изолираната РНК от замърсяваща я ДНК.....	342
9.3. За обратна транскрипция на иРНК до кДНК.....	342
9.4. За амплификация на ДНК чрез PCR.....	342
9.5. За електрофоретичен анализ на продуктите от RT-PCR	344
10. Апаратура и консумативи, използвани при провеждане на трансфекционни експерименти	344
10.1. Реагенти, подпомагащи процеса на трансфекция	344

10.2. Апаратура и консумативи, използвани при размножаване на плазмидите	345
10.3. Апаратура и консумативи, използвани при изолиране и пречистване на размножените плаزمиди	345
10.4. Апаратура и консумативи, използвани при линеаризиране на плазмидите	346
10.5. За електрофоретичен анализ на линеаризираните плазмиди.....	346
10.6. За селекция на стабилно трансфектирани клетки	347

Използвани съкращения

17-AAG	17-алиламино-17-деметоксигелданамицин
17-DMAG	17-деметокси-17-диметиламиноетиламиногелданамицин
2ME	2-метоксиестрадиол
ААС	атомно-абсорбционна спектрометрия
АТФ	аденозинтрифосфат
АТХСК	автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки
АФХ	алкилфосфохолин(и)
ВТЕ	венозен тромбоемболизъм
ГП	глутатионпероксидаза
ДАГ	диацилглицерол
ДВТ	дълбока венозна тромбоза
ДИК	дисеминирана интравазална коагулация
ДМАК	диметиларсинова киселина
ДМСО	диметилсулфоксид
ДНК	дезоксирибонуклеинова киселина
ЕПР	ендоплазмен ретикулум
иРНК	информационна РНК
кДНК	ДНК-копие, получено чрез обратна транскрипция на иРНК
ЛДХ	лактат-дехидрогеназа
ЛФК	лизофосфатидна киселина
ММ	мултиплен миелом
МП	малигнени плазмоцити, миеломни клетки
МТТ	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиев бромид
МХТ	монохимиотерапия
НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НЛР	нежелана лекарствена реакция
НХДММ	не-хипердиплоиден мултиплен миелом
НХЛ	неходжкинов лимфом
ОЛЛ	остра лимфоцитна левкемия
ОМЛ	остра миелоидна левкемия
ОПЛ	остра промиелоцитна левкемия
ПХТ	полихимиотерапия
РКР	реактивни кислородни радикали
РНК	рибонуклеинова киселина
СКМК (BMSCs)	стромни костно-мозъчни клетки
СМС	сфингомиелинсинтаза
ТР	тиоредоксинредуктаза
ФК	фосфатидна киселина
ФТИ	фарнезилтрансферазни инхибитори
ФХ	фосфатидилхолин
ХДАИ	хистондеацетилазни инхибитори
ХДММ	хипердиплоиден мултиплен миелом
ХК	холинкиназа
ХЛЛ	хронична лимфоцитна левкемия
ХМЛ	хронична миелоидна левкемия
ХФТ	холин-фосфотрансфераза
ЦДФ	цитидиндифосфат

ЦТФ	цитидинтрифосфат
ЦФЦТ	ЦТФ:фосфохолин-цитидилтрансфераза
чХГТ	човешки хорионгонадотропин
AQP	аквапорин
ATRA	транс-ретиноева киселина
BCA	бицинхонинова киселина
bFGF	основен фибробластен растежен фактор
BSA	говежди серумен албумин
CDK	циклин-зависима киназа
CFU	colony forming units, колония-образуващи единици
CHOP	Cyclophosphamide/Doxorubicin/Vincristine/Prednisolone
CK2	казеин-киназа 2
COX-2	циклооксигеназа-2
CRP	C-реактивен протеин
СТхВ	субединица В на холератоксина
DAPI	4',6-диамидин-2`-фенилиндол дихидрохлорид
DISC	death inducing signalling complex, сигнален комплекс, индуциращ клетъчна смърт
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Германска сбирка от микроорганизми и клетъчни култури)
DTT	дитиотрейтол
EDTA	етилендиаминтетраоцетна киселина
EGFR	рецептор за епидермален растежен фактор
EMA	European Medicines Agency (Европейска агенция по лекарствата)
ERK	extracellular signal-regulated kinase, киназа, регулирана от извънклетъчни сигнали
FasL	Fas-лиганд
FBS	фетален телешки серум
FDA	Food and Drug Administration (агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ)
FGFR	рецептор за фибробластен растежен фактор
FITC	флуоресцеинизотиоцианат
GA	гелданамицин
GAPDH	глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа
GM-CSF	гранулоцитно-макрофагеален колония-стимулиращ фактор
HDAC	хистондеацетилаза
HDL	липопротеини с висока плътност
HGF	хепатоцитен растежен фактор
HPC	хексадецилфосфохолин
HRP	пероксидаза от хрян
IAP	inhibitor of apoptosis protein, протеин, инхибиращ апоптозата
IC ₅₀	средна инхибираща концентрация
IFN	интерферон
IGF-1	инсулиноподобен растежен фактор 1
IGF-1R	рецептор за IGF-1
IKK	IkB-киназа
IL	интерлевкин
JAK	Янус киназа
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase, киназа, фосфорилираща c-Jun в N-терминалната област

LDL	липопротеини с ниска плътност
MAPK	митоген-активирана протеинкиназа
M-CSF	макрофагеален колония-стимулиращ фактор
MES	2-(N-морфолино)етансулфонова киселина
MGUS	моноклонална гамопатия с неизяснена значимост
MIP	макрофагеален възпалителен протеин
MMP	матриксна металопротеиназа
MOPS	3-(N-морфолино)пропансулфонова киселина
MP	Melphalan/Prednisolone
MPR	Melphalan/Prednisone/Lenalidomide
MPT	Melphalan/Prednisolone/Thalidomide
MPV	Melphalan/Prednisone/Bortezomib
MSK	mitogen- and stress-activated protein kinase, протеин-киназа, активираща се от митогени и стрес
MTD	максимална поносима доза
NF-κB	ядрен фактор κB
OPC	октадецилфосфохолин
OPG	остеопротегерин
OPN	остеопонтин
PARP	поли(АДФ-рибоза)-полимераза
PCR	полимеразна верижна реакция
PDK	фосфоинозитид-зависима киназа
PEG	полиетиленгликол
PI3K	фосфатидилинозитол-3-киназа
PIP ₂	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
PIP ₃	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
PKB (PKC, PKD)	протеин-киназа B (C, D)
PLC (PLD)	фосфолипаза C (D)
PMSF	фенилметилсулфонилфлуорид
PVDF	поливинилидендифлуорид
RANK	рецептор-активатор на NF-κB
RANKL	лиганд за рецептора-активатор на NF-κB
rhOPN	рекомбинантен човешки остеопоптин
RT	обратна транскрипция
SAOS-2 CM	кондиционирана среда от клетки SAOS-2
SDF-1	произвеждан от стромните клетки растежен фактор 1
SDS	натриев додецилсулфат
SF	фракция на преживелите клетки
STAT	signal transducer and activator of transcription, сигнален трансдуктор и транскрипционен активатор
Sβ ₂ M	серумен β ₂ -микроглобулин
TGFβ	трансформиращ растежен фактор бета
TGFβ-R	рецептор за TGFβ
TNF-α	тумор-некротичен фактор алфа
TRAIL	TNF-сроден апоптозоиндуциращ лиганд
VAD	Vincristine/Doxorubicin(Adriamycin)/Dexamethasone
VEGF	съдово-ендотелен растежен фактор
VEGFR	рецептор за VEGF
VRD	Bortezomib/Lenalidomide/Dexamethasone
VTD	Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone

Увод

Мултиплиеният миелом е сравнително често хематологично злокачествено заболяване. Липсата на възможност за пълно излекуване и настъпващата тежка инвалидизация на болните в терминалните стадии го правят изключително социално значимо. Страничните ефекти от основния терапевтичен подход – химиотерапията, допълнително утежняват положението на пациентите. През последното десетилетие класическата химиотерапия отстъпва място на нови фармакологични подходи, насочени към патологично изменените сигнално-трансдукционни пътища. Новите лекарствени вещества, макар и по-ефективни, далеч не са лишени от странични ефекти. Затова продължава да е налице огромна необходимост от откриване и въвеждане в практиката на нови терапевтични възможности, имащи по-висока ефективност и по-ниска токсичност от съществуващите.

I. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Мултиплен миелом – биологични особености и нови терапевтични стратегии

1.1. Обща характеристика

Мултипленият миелом (ММ) е хематологично злокачествено заболяване, което се характеризира със злокачествен растеж на плазмоцити в костния мозък, а с прогресирането на болестта и извън него (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Малигнените плазмоцити (МП) секретират моноклонал имуноглобулин – парапротеин. Чести усложнения са костни увреждания, хиперкалциемия, бъбречна недостатъчност и анемия (Kenealy and Prince 2006). Мултипленият миелом е сравнително често злокачествено заболяване и съставлява 10-15 % от случаите на злокачествени неоплазии в хематологията и 1 % от случаите на злокачествени неоплазии изобщо (Parkin, Bray et al. 2005). В повечето случаи ММ възниква от еволюцията на премалигнено състояние, наречено моноклонална гамопатия с неизяснена значимост (MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance), което засяга около 3% от населението над 50-годишна възраст (Kyle, Therneau et al. 2006). Засега ММ е неизлечимо заболяване, но терапията може да удължи продължителността и подобри качеството на живота. Чрез комбинирането на вискодозна химиотерапия с автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки (АТХСК), която се наложи като стандарт в лечението на пациенти под 65 год., може да се постигне средна преживяемост от 5 години и повече (Harousseau, Moreau et al. 2005; Mihelic, Kaufman et al. 2007). В последно време бяха постигнати значителни успехи, свързани с изясняване на молекулярната биология на мултипленият миелом и особено изключителната важност на взаимодействието между МП и костно-мозъчната среда като фактор, който стимулира пролиферацията на МП и ги предпазва от апоптоза. Тези успехи послужиха като основа за създаване на нови лекарства, действащи върху конкретни мишени.

1.2. Биология и патофизиология на мултипления миелом

Миеломните клетки се характеризират с ниска скорост на пролиферация и силна зависимост от костно-мозъчната микросреда. Те са лимфоцити, произхождащи от герминативния център на лимфен възел (Piazza, Gurrieri et al. 2007).

1.2.1. Генетична характеристика

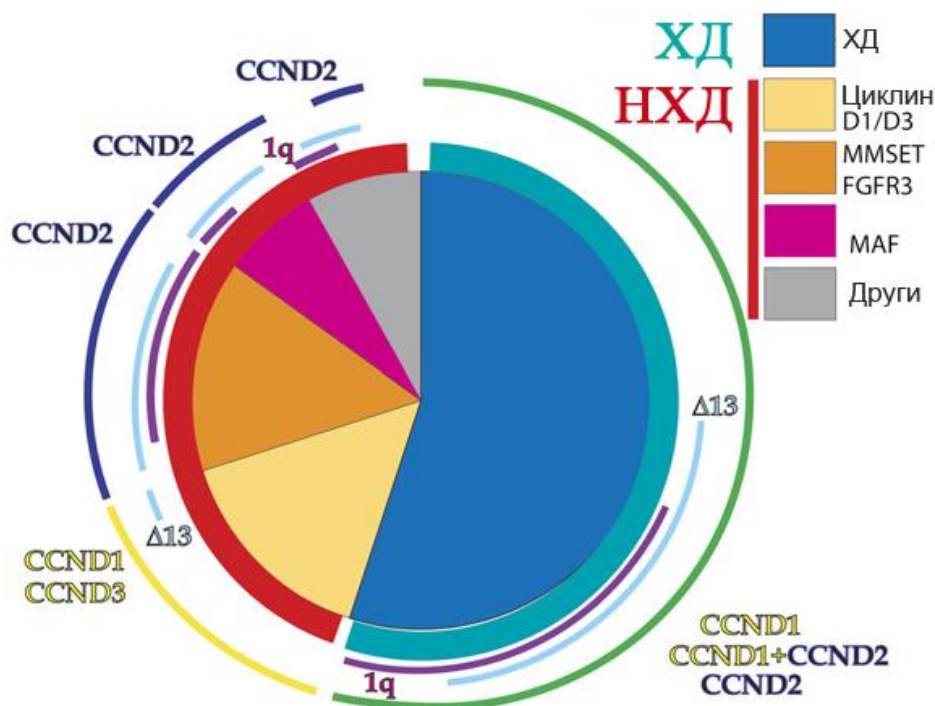
ММ е хетерогенно заболяване. Общо явление обаче е повишената експресия на поне един от гените за циклините от тип D – *CCND1*, *CCND2* и *CCND3* (Zhou, Barlogie et al. 2009). Случаите на ММ могат да се разделят на две големи групи въз основа на наблюдаваните бройни хромозомни аберации (Smadja, Fruchart et al. 1998):

- хипердиплоиден ММ (ХДММ) – при него броят на хромозомите е от 48 до 74, като най-характерна е тризомията по отношение на някои нечетни хромозоми – 3., 5., 7., 9., 11., 15., 19. и 21);
- не-хипердиплоиден ММ (НХДММ) – обхваща случаите с хиподиплоиден, псевдодиплоиден или тетраплоиден кариотип.

В общия случай ХДММ има по-благоприятна прогноза. Обхваща 50-60% от случаите на ММ (Smadja, Bastard et al. 2001).

При ММ и MGUS често се наблюдават специфични хромозомни транслокации, засягащи имуноглобулиновите локуси. Наричат се още първични транслокации, тъй като се установяват още в най-ранните фази на болестта. Смята се, че се причиняват от грешки при превключване на типа тежка верига или по-рядко от грешки при соматичната хипермутация в зародишния център (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Установено е, че различни гени могат да бъдат фузионни партньори на генния locus за тежките вериги на имуноглобулините (14q32), като в 40% от случаите на ММ и MGUS фузионен партньор е един от следните пет гена: (1) *MMSET*, а обикновено и *FGFR3* в 4p16; (2) *CCND3* в 6p21; (3) *CCND1* в 11q13; (4) *c-MAF* в 16q23; и (5) *MAFB* в 20q11. Изброените транслокации са характерни най-вече за НХДММ (Tonon 2007). Първата от тях е свързана с лоша прогноза и се среща при 15–20% от пациентите. ММ има сравнително по-благоприятен ход при t(11; 14), срещаща се в 15–20% от случаите (Kenealy and Prince 2006). Транслокациите t(14;16)(q32.3;q23) и t(14;20)(q32;q11) водят съответно до свръхекспресия на c-MAF или на MAFB. Честотите им са 5-10%, съотв. 2-5% от всички случаи

на ММ и също са свързани с лоша прогноза (Tonon 2007). При тях се наблюдава свръх-експресия на циклин D2 и интегрин b7, повишена адхезия на малигнените плазмоцити към костно-мозъчната строма и повишена продукция на съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF). Костните увреждания при тази подгрупа пациенти обаче са по-редки, което вероятно е свързано с понижената експресия на DKK1 и повишената на остео-понтин.



Фиг. I.1. Генетична класификация на ММ и приблизително честотно дялово разпределение на отделните форми (Tonon 2007). Означения: ХД – хипердиплоиден, НХД – не-хипердиплоиден.

С лоша прогноза са свързани и следните вторични (допълнително възникващи) мутации: дупликация на 1q21-22 и съотв. гени като *Mcl1*, *IL6R* и др.; хомозиготна делеция на сегмента 13q14, в който са локализирани тумор-супресорните гени *RB1* и *TRIM13*, или по-често делеция на цяла тринадесета хромозома ($\Delta 13$); дупликация на 8q24 и съотв. *MYC*; различни транслокации, инверсии и др. мутации, засягащи *MYC*; делеция на 16q11-12 и съотв. алелна загуба на тумор-супресорния ген *CYLD* и др. гени; делеция на 17p13-12 и съотв. алелна загуба на *p53* и др. гени; делеция на 1p; мутации в *KRAS* и *NRAS* (Kenealy, Prince et al. 2006; Tonon 2007).

1.2.2. Взаимодействия между миеломните клетки и костно-мозъчната микросреда

Още в края на XIX век Stephen Paget предлага „хипотезата за семето и почвата”, според която мястото на развитие на метастази се определя от взаимодействието на туморните клетки („семето”) с локалната микросреда на органите („почвата”). Когато „почвата” на даден вид тъкан е подходяща за оцеляването и пролиферацията на туморните клетки, тогава е и по-вероятно те да образуват метастази (Paget 1889). Задълбочени изследвания през последното десетилетие показаха, че ММ е много добър пример, илюстриращ взаимодействията тумор-микросреда (Mitsiades, McMillin et al. 2007).

Костно-мозъчната микросреда включва широк спектър от клетъчни и извънклетъчни компоненти, които повлияват поведението на МП. Такива са например протеините от извънклетъчния матрикс (фибронектин, колаген и ламинин); хемопоеични стволови клетки в различни стадии на диференциация; стромните костно-мозъчни клетки (СКМК, BMSCs); ендотелните клетки; остеобластите и остеокластите (Mitsiades, McMillin et al. 2007).

СКМК са хетерогенна популация от мезенхимни клетки, морфологично наподобяващи фибробласти. Смята се, че подкрепят оцеляването, пролиферацията и диференциацията на нормалните хемопоеични стволови клетки (Mitsiades, McMillin et al. 2007). За разлика от нормалните хемопоеични клетки, МП отговарят на стимулите от страна на СКМК (цитокини, растежни фактори, адхезионни молекули) не с диференциация, а с ускоряване на пролиферацията и придобиване на резистентност към различни проапоптотични стимули (Mitsiades, Mitsiades et al. 2004). Най-важните фактори от страна на СКМК са интерлевкин-6 (IL-6) и адхезионната молекула ICAM-1. IL-6 се секретира от СКМК, когато са в контакт с МП или са изложени на действието на тумор-некротичен фактор алфа (TNF- α), съдово-ендотелен растежен фактор (VEGF) или трансформиращ растежен фактор бета (TGF β) (Rawlings, Rosler et al. 2004; Molina and Adjei 2006). МП обаче също могат да придобият способността да секретират IL-6. Серумните нива на IL-6 и рецептора му са прогностични маркери при ММ. TNF- α се продуцира от МП и стимулира секрецията на IL-6 чрез активиране на NF- κ B и повишаване на експресията на адхезионни молекули (VLA-4 при МП и VCAM-1 и ICAM-1 при СКМК и ендотелните клетки) (Piazza, Gurrieri et al. 2007). VEGF, MIP-1 α и MIP-1 β също се произвеждат и от МП, и от СКМК (Hjertner, Standal et al. 2006; Kenealy and Prince 2006). VEGF стимулира ангиогенезата, пролиферацията на МП и секрецията на цитокини в костно-мо-

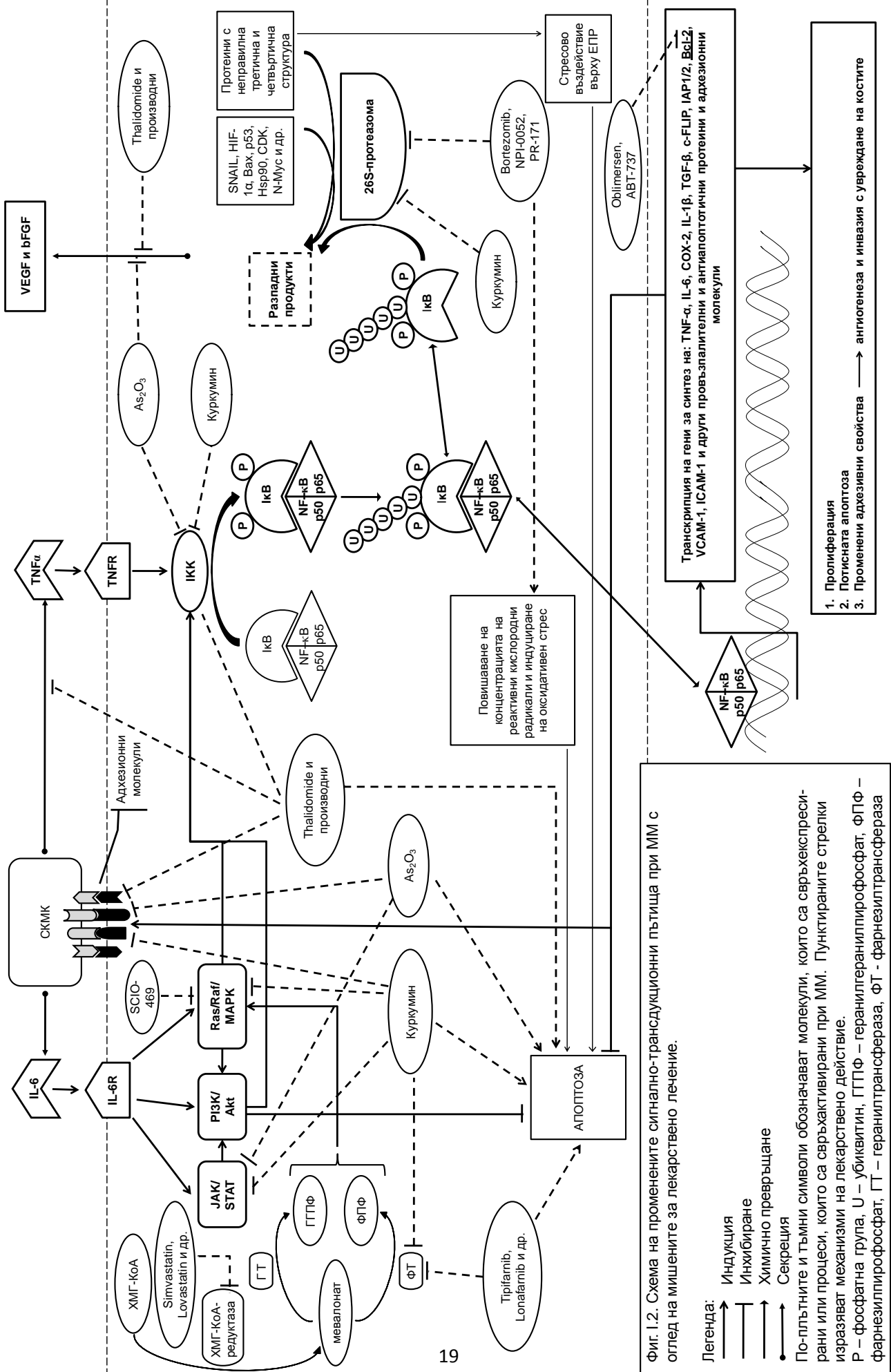
зъчната микросреда. Други фактори, произвеждани в костно-мозъчната микросреда са инсулиноподобният растежен фактор 1 (IGF-1) и произвежданият от стромните клетки растежен фактор 1 (SDF-1). Те стимулират пролиферацията и миграцията на МП и повишават тяхната лекарствена резистентност чрез активиране на Akt и предпазване от дексаметазон-индуцирана апоптоза (Kenealy and Prince 2006).

Подобно на СКМК, костно-мозъчните ендотелни клетки също стимулират пролиферацията на МП, като това става най-вече чрез посредничеството на VEGF, основния фибробластен растежен фактор (bFGF) и хепатоцитния растежен фактор (HGF) (Mitsiades, McMillin et al. 2007). Освен това ендотелните клетки поемат и натрупват циркулиращия SDF-1 (Dar, Goichberg et al. 2005). SDF-1 е основният хемоатрактант, който индуцира трансендотелната миграция на МП и заселването им в костния мозък (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006). МП експресират рецептор за SDF-1, който се означава като CXCR4. Свързването на SDF-1 с CXCR4 повишава адхезионната активност на интегрин VLA-4, известен още като $\alpha_4\beta_1$. Взаимодействието на $\alpha_4\beta_1$ с VCAM-1, експресиран от ендотелните клетки, осигурява адхезията на МП към ендотела и улеснява проникването им в костния мозък. Там те се свързват със СКМК и фибронектина, отново чрез $\alpha_4\beta_1$. Това стимулира СКМК да секретират VEGF и IL-6, като от своя страна VEGF стимулира пролиферацията на ендотелните клетки, а IL-6 допълнително активира сигналния път SDF-1/CXCR4 (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006; Mitsiades, McMillin et al. 2007). Също така в МП се повишава нивото на p27^{Kip1}, активира се транскрипционният фактор NF- κ B и се индуцира резистентност към конвенционалните химиотерапевтици.

Други фактори, които стимулират миграцията на МП и за които се смята, че са от значение за настаняването им (“homing”) в костния мозък са VEGF, HGF, MIP-1 α и IGF-1 (Mitsiades, McMillin et al. 2007). Наскоро бяха открити и хемоатрактанти като I-TAC, Mig и IP10, секретирани предимно от моноцитите и макрофагите. Тези хемоатрактанти се свързват с рецептора CXCR3 (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006).

Други важни адхезионни молекули по повърхността на МП освен VLA-4 са CD44, VLA-5, LFA-1, NCAM (CD56), ICAM-1 (CD54), синдекан-1 (CD138) и MPC-1 (Mitsiades, McMillin et al. 2007).

Цитокините и растежните фактори, секретирани от СКМК и другите клетки в костно-мозъчната микросреда, а също и прекият контакт на МП с тези клетки и с протеините на извънклетъчния матрикс стимулират редица пролиферативни/антиапоптотични сигнални пътища в МП (фиг. 1.2). Най-добре проучени са ефектите върху сигналните пътища PI-3K/Akt/mTOR/p70S6K, IKK- α /NF- κ B, Ras/Raf/MAPK и JAK/STAT3



Фиг. 1.2. Схема на променените сигнално-транскрипционни пътища при ММ с оглед на мишените за лекарствено лечение.

(Mitsiades, McMillin et al. 2007). PI-3K/Akt/mTOR/p70S6K може да се активира и пряко, чрез JAK/STAT и Ras/Raf/MAPK. Активирането на PI-3K/Akt води до повишаване на експресията на каспазни инхибитори (напр. FLIP и cIAP-2), антиапоптотични протеини от семейството на Bcl-2 и циклини от тип D. Освен това се фосфорилират и инактивират някои проапоптотични протеини (Mitsiades, Mitsiades et al. 2004). Тези ефекти способстват за предпазване на клетките от апоптоза, както и за индукция на лекарствена резистентност (Kenealy and Prince 2006). Смята се, че най-важните цитокини в патогенезата на ММ са IL-6 и IGF-1. Те могат да активират всички гореспоменати сигнални пътища. Активирането на рецептора за IGF-1 (IGF-1R) засилва теломеразната и протеазомната активност, сенсibiliзира МП към други цитокини (напр. IL-6), стимулира продукцията на проангиогенни цитокини като VEGF (Mitsiades, McMillin et al. 2007).

Сигналните пътища Ras/Raf/MAPK и PI3K/Akt осъществяват много от ефектите си чрез транскрипционния фактор NF-κB. Когато клетката не е изложена на въздействието на стимули, NF-κB е секвестриран в неактивна форма в цитоплазмата чрез свързване с инхибитора IκBα (Folmer, Blasius et al. 2006). Сигналите за активиране на NF-κB действат чрез киназния комплекс ИКК, който фосфорилира IκBα. След фосфорилиране IκBα става обект на убиквитинилиране и се разгражда от 26S-протеазомата (Hideshima, Chauhan et al. 2002). Това позволява транслоцирането на NF-κB в ядрото на клетката, където той се свързва със специфични ДНК-последователности в промоторите на прицелните гени и така стимулира тяхната транскрипция. Сред тях са гени за цитокини (напр. IL-6), хемокини, адхезионни молекули (VCAM-1 и ICAM-1), регулатори на клетъчния цикъл, инхибитори на апоптозата (Bcl-2, Bcl-XL, XIAP и survivin), COX-2 и др. Много от тези протеини допълнително засилват активността на NF-κB. Обикновено в миеломните клетки NF-κB е конститутивно активен. Този факт може да се обясни със свърхактивната казеин-киназа 2 (СК2) в МП. Нормално СК2 фосфорилира IκBα в В-лимфоцитите и предизвиква разграждането му.

Взаимодействието между миеломните клетки и костно-мозъчната среда се отразява и на костната структура – настъпва разрушаване на костната тъкан (остеолитични костни промени) чрез нарушаване на баланса между генерирането на остеобласти и активирането на остеокластите (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Адхезията на миеломните клетки към костно-мозъчните фибробласти индуцира последните да секретират остеокласт-активиращи фактори като IL-1β, IL-6, M-CSF, bFGF, MIP-1α, MIP-1β, IGF-1 и TNF-α (Chng, Lau et al. 2005; Yaccoby, Wezeman et al. 2006; Lentzsch, Ehrlich et al. 2007). Тези фактори повишават секрецията на RANKL (лиганд за рецептора-активатор на NF-

кВ) от страна на остеобластите и СКМК (Mitsiades, McMillin et al. 2007). RANKL се свързва с RANK (рецептора-активатор на NF-кВ), експресиран на повърхността на миелоидните прогенитори и стимулира диференциацията им до зрели остеокласти, способни да резорбират костното вещество (Hjertner, Standal et al. 2006). RANKL въздейства и върху зрелите остеокласти като инхибира апоптозата и така увеличава преживяемостта им. Остеопротегеринът (OPG) представлява разтворим рецептор за RANKL и като такъв инхибира свързването на RANKL с RANK и произтичащите от това ефекти (Lacey, Timms et al. 1998). Активността на остеокластите зависи от финия баланс между концентрациите на RANKL и OPG. По-високата стойност на отношението RANKL/OPG при ММ се дължи не само на интензивната секреция на RANKL, но и на понижаване на концентрацията на OPG. МП постигат това като от една страна свързват OPG чрез синдекан-1 (CD138), интернализират го и го разграждат в лизозомите, а от друга инхибират синтеза на OPG в остеобластите (Hjertner, Standal et al. 2006).

MIP-1 α може да стимулира остеоκластогенезата и без посредничеството на RANKL, свързвайки се пряко с рецепторите CCR1 и CCR5. Миеломните клетки също експресират тези рецептори и свързването на MIP-1 α с тях повишава адхезивните свойства на миеломните клетки и активира сигнални пътища, ускоряващи пролиферацията и предпазващи от апоптоза (Choi, Oba et al. 2001; Oba, Lee et al. 2005; Lentzsch, Ehrlich et al. 2007).

В ранната фаза на ММ и при MGUS усилената костна резорбция се компенсира от повишена активност на остеобластите. С прогресиране на заболяването остеобластите вече не могат да компенсират повишената активност на остеоκластите и се формират остеолитични лезии (Yeh and Berenson 2006). Освен това МП пряко инхибират пролиферацията и диференциацията на остеобластите. От една страна, чрез свързване на VLA-4 на повърхността на МП с VCAM-1 на повърхността на предшествениците на остеобластите се потиска активността на транскрипционния фактор Runx2, който е важен за диференциацията до зрели остеоκласти (Giuliani, Colla et al. 2005). От друга страна, в около 1/3 от случаите на ММ миеломните клетки секретират фактора „dickkopf1” (DKK1). DKK1 е инхибитор на сигналния път на гликопротеините от семейството на Wnt (Tian, Zhan et al. 2003). Той се свързва с LRP5 и LRP6 (рецептори за Wnt), което се последва от тяхната интернализация и намаляване на плътността им на клетъчната повърхност (Yeh and Berenson 2006). По този начин също се намалява активността на Runx2. Сходни ефекти върху сигналния път на Wnt има и протеинът sFRP-2, който също може да се секретира от МП, макар и в по-малък процент от общия брой случаи на

ММ (Tian, Zhan et al. 2003; Oshima, Abe et al. 2005; Mitsiades, McMillin et al. 2007). IL-3 и IL-7 имат повишени нива при значителен процент от пациентите с ММ и също потискат остеобластогенезата (Lentzsch, Ehrlich et al. 2007).



Фиг. 1.3. Остеолитични костни лезии в черепа на пациент с ММ (Munker 2007).

В крайна сметка разрушаването на костната тъкан при ММ се проявява като дифузна остеопения, фокални литични лезии, патологични и компресионни фрактури, хиперкалциемия и болки в костите (Yeh and Berenson 2006). Около 70% от пациентите с ММ получават литични лезии, а още 20% страдат от тежка остеопения без литични лезии (Kyle, Gertz et al. 2003). При резорбцията на костната тъкан допълнително се освобождават още цитокини и растежни фактори, някои от които (IL-6, IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , IGF и TNF- α) поддържат жизнеспособността, пролиферацията и резистентността на МП. Така възниква един порочен кръг от костна резорбция и туморен растеж (Mitsiades, McMillin et al. 2007).

В обобщение може да се каже, че биологичното поведение на МП се определя от съчетанието на техните генетични промени и стимулите, на които са изложени в костно-мозъчната микросреда. Генетичните промени в МП повлияват естеството на взаимодействията им с костно-мозъчната микросреда и функционалните последиствия (Mitsiades, McMillin et al. 2007). Например, свръхекспресията на c-MAF в МП с t(14;16) повишава експресията на интегрин β 7 като така се повишава адхезията към

СКМК (Hurt, Wiestner et al. 2004). МП с хипердиплоиден кариотип са силно зависими от костно-мозъчната микросреда, за която се предполага, че по все още неизвестен механизъм индуцира експресията на циклин D1 в МП, независимо че те в случая нямат транслокации засягащи гена за този циклин (Bergsagel, Kuehl et al. 2005).

1.2.3. Патогенеза на други усложнения при мултиплен миелом

При около 25% от пациентите с ММ възниква бъбречна недостатъчност. Основната причина за това е увреждането на тубулите от леките имуноглобулинови вериги. Те се филтрират през гломерулите, след което могат да се отложат в тубулите (Blade and Rosinol 2007). Имуноглобулините могат да се отлагат и в базалната мембрана на гломерулите, предизвиквайки нефрозен синдром. Частично метаболизираните леки имуноглобулинови вериги могат да увредят мембранните транспортери в проксималните тубулни клетки, довеждайки до развитие на синдром на Fanconi, характеризиращ се със загуба на глюкоза и аминокиселини, както и с нарушаване на концентрационната способност на бъбреците (Ma, Lacy et al. 2004). Отлаганията на амилоид в гломерулите, хиперурикемията, повтарящите се инфекции и инфилтрацията с миеломни клетки също могат да допринесат за развитие на бъбречно увреждане (Sengul, Zwizinski et al. 2003).

Заместването на нормалния костен мозък от МП и инхибирането на хемопоезата от различни туморни фактори води до развитието на анемия. Например MIP-1 α потиска пролиферацията на хемопоетичните стволови клетки (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006). Допълнителни фактори, водещи до развитие на анемия при ММ, са: дефицит на еритропоетин, бъбречна недостатъчност, химио- или лъчетерапия, както и недостиг на витамин В₁₂ или фолиева киселина (Blade and Rosinol 2007). В зависимост от физикохимичните свойства и количеството на парапротеина може да се развие хипервискозитетен синдром (най-често когато парапротеинът е IgM, IgG3 или IgA). Взаимодействието на парапротеина с тромбоцитите и с някои от факторите на кръвосъсирването (I, II, V, VII и VIII) може да доведе до нарушения в кръвосъсирването и последващи кръвоизливи в резултат на развиващ се ДИК-синдром (Fauci and Harrison 2008).

При ММ производството на нормални антитела е понижено, а катаболизъмът им е ускорен – нарушава се имунната реакция, особено срещу полизахаридните антигени (Fauci and Harrison 2008). MIP-1 β потиска диференциацията на предшествениците на В-лимфоцитите (Aggarwal, Ghobrial et al. 2006). Нарушават се и функциите на гранулоцитите и комплемента. IL-6, VEGF и TGF β потискат стимулирането на Т-клетките от

страна на дендритните клетки (Quach, Ritchie et al. 2010). Всичко това води до развитие на имунна недостатъчност и съпътстващи инфекции – най-често пневмонии и пиелонефрити (Fauci and Harrison 2008).

1.3. Стадиране на мултипления миелом

За стадиране на ММ широко се използва системата на Durie и Salmon, създадена през 1975 г. В нея са разграничени 3 стадия на заболяването в зависимост от степента на костно увреждане и серумните нива на хемоглобина, калция и парапротеина (Durie and Salmon 1975). През 80-те години на XX век се установи, че най-важният фактор, определящ прогнозата на ММ, е нивото на серумния β_2 -микроглобулин ($S\beta_2M$) (Bataille, Durie et al. 1983; Durie, Stock-Novack et al. 1990). $S\beta_2M$ е много чувствителен индикатор за бъбречната функция. Наскоро бе предложена проста Международна система за стадиране на ММ (ISS – International Staging System), основана само на нивата на $S\beta_2M$ и албумина (Greipp, San Miguel et al. 2005):

Стадий	Критерии	Средна преживяемост (месеци)
I	$S\beta_2M < 3,5 \text{ mg/l}$, серумен албумин $\geq 3,5 \text{ mg/l}$	62
II	$S\beta_2M < 3,5 \text{ mg/l}$, серумен албумин $< 3,5 \text{ mg/l}$ или $3,5 \text{ mg/l} \leq S\beta_2M < 5,5 \text{ mg/l}$, независимо от нивото на албумина	44
III	$S\beta_2M \geq 5,5 \text{ mg/l}$	29

C-реактивният протеин (CRP) и α_1 -антитрипсинът са сурогатни маркери за нивото на IL-6 и също могат да се използват за прогнозиране на преживяемостта на пациентите. Съществува система за стадиране на ММ, основана на серумните нива на CRP и $S\beta_2M$, според която се различават три групи: ниско-рискова (CRP и $S\beta_2M \leq 6 \text{ mg/l}$; средна преживяемост 54 месеца); средно-рискова (CRP или $S\beta_2M \geq 6 \text{ mg/l}$; средна преживяемост 27 месеца); високо-рискова (CRP и $S\beta_2M \geq 6 \text{ mg/l}$; средна преживяемост 6 месеца) (Bataille, Voccadoro et al. 1992). Установено е, че нивото на синдекан-1 (CD138) също е независим прогностичен маркер (Seidel, Sundan et al. 2000).

Степента на костно увреждане корелира с маркери като: нива на пиридинолин и десокзипиридинолин в урината; серумни нива на SDF-1, RANKL, IL-6 и металопротеиназа-9 (Fonseca and San Miguel 2007).

1.4. Класическа химиотерапия на мултипления миелом

При около 10% от пациентите болестта прогресира бавно. В такива случаи се препоръчва противотуморна химиотерапия едва когато концентрацията на парапротеина надвиши 50 g/l или започнат да се развиват костни увреждания (Fauci and Harrison 2008). Обикновено индукционното лечение се провежда като монотерапия с един алкилиращ агент (Melphalan, Chlorambucil или Cyclophosphamide) в комбинация с глюкокортикоид. Предпочита се интермитентното (прекъснато) лечение – ежемесечни курсове от 4 до 10 дни. Около 50% от болните лекувани с монотерапия, постигат ремисии (предимно частични) след различно дълъг период от време – от няколко месеца до една година. Отговарящите на лечението пациенти („респонденти“) обикновено получават задоволително облекчаване на болките в костите, хиперкалциемията и анемията, а и обикновено по-рядко получават инфекции. За понижаване на концентрацията на парапротеина обаче са необходими от 4 до 6 седмици. В случаите, когато се образуват само леки вериги, понижението може да се наблюдава още в първата седмица на лечението (Fauci and Harrison 2008).

Ако лечението започне с полихимиотерапия (ПХТ), ремисии се постигат при до 70% от болните. Използват се комбинации от циклофосфамид, мелфалан, винкристин, кармустин, доксорубин и кортикостероиди. Една от най-често използваните схеми е VAD (Vincristine/Doxorubicin(Adriamycin)/Dexamethasone). Въпреки по-високата честота на ремисиите от ПХТ, засега не е доказано съществено предимство пред монохимиотерапията (МХТ) по отношение преживяемостта на болните (Rajkumar and Palumbo 2007). ПХТ се препоръчва при резистентни на МХТ пациенти и при настъпване на рецидив. VAD се препоръчва като индукционна терапия при пациенти, които след това ще бъдат подложени на АТХСК, защото се отличава с по-ниска миелотоксичност в сравнение с алкилиращите цитостатици (Kyle and Rajkumar 2004). VAD обаче има и характерни недостатъци – необходимост от централен венозен катетър и свързани с това риск от инфекции и тромботични усложнения; невротоксичност на винкристина (Rajkumar and Palumbo 2007). При това ролята на винкристина и доксорубина в тази

схема е ограничена – терапевтичният ефект се дължи основно на дексаметазона. Трябва да се има предвид, че присъствието на кортикостероиди в терапевтичните схеми ускорява развитието на остеопороза и така може да допринесе за увеличаване на честотата на вторичните фрактури, които драстично снижават качеството и продължителността на живота на пациентите с ММ. Ако след ПХТ се проведат два последователни курса с Melphalan във високи дози, всеки от тях последван от трансплантация на хемопоетични стволови клетки от периферна кръв, може да се постигне пълна ремисия при 50% от пациентите. Подобно лечение обаче е свързано и с висока смъртност, особено ако трансплантацията е алогенна (Fauci and Harrison 2008).

По принцип продължителността на лечението се определя според терапевтичния отговор. Препоръчва се спирането му след постигане на стабилна едногодишна ремисия. Рецидивите настъпват към края на първата година от спиране на терапията. Критериите за рецидив са покачване на парапротеина с 50% от нивото му по време на ремисия. Повторното лечение може да постигне втора ремисия при до 80% от пациентите. Всяка следваща ремисия трае все по-кратко. С цел удължаване на ремисията, след постигането ѝ се прилага поддържаща терапия. Има данни, че поддържащо лечение, базирано само на перорален преднизон (50 mg през ден), значително удължава продължителността на ремисията и повишава преживяемостта (Mihelic, Kaufman et al. 2007). Пациентите, които са първично резистентни към първоначалната терапия, имат средна преживяемост под една година. При такива пациенти пулсово лечение с глюкокортикоиди във високи дози, приложени самостоятелно или успоредно с VAD, могат да са адекватно палиативно лечение.

1.5. Трансплантация на хемопоетични стволови клетки

Автоложната трансплантация на хемопоетични стволови клетки (АТХСК) е стандартно лечение на ММ при пациенти под 65 год. (San-Miguel and Mateos 2009). Многоцентрови рандомизирани клинични проучвания показват превъзходството на АТХСК спрямо конвенционалната химиотерапия по отношение на честотата на постигане на ремисия и общата преживяемост (Attal, Harousseau et al. 1996; Child, Morgan et al. 2003). АТХСК е възможна и при пациенти над 65 год., но за тях обичайната кондиционираща терапия (мелфалан 200 mg/m²) е прекалено агресивна. Доказано е, че при възрастовата група от 65 до 70 години, лечение, базирано на два терапевтични курса с мелфалан в

доза 100 mg/m^2 , всеки от които последван от АТХСК, е по-резултатно в сравнение с конвенционалната химиотерапия. Проучват се възможностите за прилагане на АТХСК и при пациенти над 70 г. Редица данни показват, че принципно двукратната (тандемна) АТХСК постига по-висока честота на пълна ремисия отколкото еднократната. АТХСК обаче не се препоръчва при пациенти с терминална бъбречна недостатъчност (Harousseau 2007). Най-важните прогностични маркери за успеха на АТХСК са нивото на $S\beta_2M$ и наличието на хромозомни аберации. Пациентите с висок $S\beta_2M$ в комбинация с $t(4;14)$ или $del(17p)$ имат лоша прогноза дори и при двукратна АТХСК (Harousseau 2007).

Алогенната трансплантация на хемопоеични стволови клетки може да индуцира по-продължителна ремисия, но този тип трансплантация се понася много по-трудно от пациентите и е свързан с висока смъртност (над 50% в някои проучвания), главно поради инфекции и реакция на присадката срещу реципиента. Ето защо този тип трансплантация може да се прилага само при малка част от пациентите с ММ – тези, които са по-млади от 55 г. и имат роднински донори със сходни HLA-антигени (Harousseau 2007). В последно време се възлагат надежди на немиелоаблативната алогенна трансплантация, известна още като мини-алогенна трансплантация. Тази разновидност съчетава сравнително висока ефективност и по-ниска пост-трансплантационна смъртност в сравнение със стандартната алогенна трансплантация. Обикновено се прилага след предходна АТХСК. Някои проучвания обаче поставят под въпрос ефективността на този подход (Crawley, Iacobelli et al. 2007).

1.6. Нови фармакологични средства за лечение на мултиплен миелом

1.6.1. Производни на талидомида

Thalidomide. Историята на талидомида започва още в началото на 50-те години на ХХ век, когато е разработван като потенциално седативно и антиепилептично средство (Melchert and List 2007). Установява се, че не притежава достатъчна антиепилептична ефективност, за да бъде регистриран с това показание, но е пуснат в употреба като сънотворно и антиеметик при бременност. Едва след това, със силното зачестяване на вродени малформации, се установява че талидомидът е тератогенен и употребата му по

време на първия триместър на бременността може да причини фокомелия, липса на ушни миди, заешка уста, дефекти в развитието на дългите кости, сърдечно-съдовата система и гастроинтестиналния тракт. Последвалите задълбочени изследвания също показват, че ефектите на талидомида далеч не се ограничават с въздействието върху нервната система. Талидомидът е имуномодулятор с многостранно действие върху хуморално- и клетъчно-опосредствания имунитет; потиска ангиогенезата като намалява образуването на TNF- α , IL-6 и други цитокини и нарушава действието на bFGF; пряко повлиява апоптозата и СКМК (Kenealy and Prince 2006). Наблюденията, че при ММ плътността на кръвоносните съдове в костния мозък е повишена и че това се отразява неблагоприятно на прогнозата, са основа за провеждане на първите клинични проучвания с Thalidomide при пациенти с ММ в края на 90-те години на XX век (Piazza, Gurtieri et al. 2007). Талидомидът е одобрен за лечение на ММ от FDA (агенцията за контрол на храните и лекарствата в САЩ) през май 2006 г. (Melchert and List 2007). От април 2008 г. е одобрен за лечение на ММ и от ЕМА (европейската агенция за контрол на лекарствата).

Талидомидът е рацемична смес от два енантиомера – S(-) и R(+). Първоначално се смятало, че S(-) енантиомерът е отговорен за тератогенното действие, а R(+) – за седативния ефект. Опитите за получаване на чист R(+) талидомид били прекратени след като се установило, че при физиологични условия бързо настъпва рацемизация. Пикова плазмена концентрация се постига 3 до 6 часа след приема. Талидомидът претърпява бърза неензимна хидролиза до повече от 12 метаболита. Той и метаболитите бързо се елиминират с урината. Средният полуживот е приблизително 5 часа (Melchert and List 2007).

Противовъзпалителната активност на талидомида се дължи основно на потискане на ефектите на TNF- α . Това от една страна се постига чрез ускорено разграждане на иРНК за синтез на TNF- α , а от друга чрез инхибиране на ИКК, което възпрепятства активирането на NF- κ B – основен регулатор на транскрипцията на гена за TNF- α (Melchert and List 2007). Като резултат се потиска освобождаването на провъзпалителни цитокини от моноцитите и макрофагите в отговор на ендотоксинова стимулация. Смята се, че потискането на TNF- α е водещо за терапевтичния ефект на талидомида при възпалителни състояния като *Erythema nodosum leprosum*. Клетъчният отговор към талидомид обаче е много сложен и всъщност при активирани Т-лимфоцити образуването на TNF- α се повишава (Marriott, Clarke et al. 2002). Повишение на концентрацията на TNF- α в серума е наблюдавано и при клинични проучвания при солидни тумори и токсична епидермална

некролиза. Талидомидът потиска образуването и на редица други провъзпалителни ензими и цитокини като COX-2, IL-1 β , TGF β , и IL-6 (Melchert and List 2007). Талидомидът освен това повишава секрецията на IL-12 и IFN- γ при активирани Т-лимфоцити. Последните два цитокина имат противотуморна и антиангиогенна активност. Талидомидът улеснява активирането на CD8+ Т-лимфоцити и то става възможно дори в отсъствие на допълнителни ко-стимулаторни сигнали, преминаващи през CD28-рецептора. Смята се, че поради имуномодулиращите си свойства талидомидът би могъл да се използва за подсилване на ефекта на противотуморни ваксини. Антиангиогенните свойства на талидомида се дължат основно на инхибиране на секрецията на VEGF, TNF- α и bFGF и съответно потискане на миграцията и адхезията на ендотелните клетки. По този механизъм талидомидът намалява и експресията на адхезионни молекули по повърхността на МП (Quach, Ritchie et al. 2010). Установено е обаче, че дори при пациентите, които се повлияват от лечението с Thalidomide, плътността на кръвоносните съдове в костния мозък не се променя (Chng, Lau et al. 2005). Независимо от имуномодулиращите си свойства, талидомидът има пряк концентрационно зависим антипролиферативен ефект при много хематологични малигноми (Melchert and List 2007). Освен това активира апоптозата едновременно на няколко различни нива – потенцира ефектите на TRAIL (TNF-свързан апоптозоиндуциращ лиганд), инхибира IAP-2, улеснява активирането на каспаза-8. Засега не е ясно кой от всички фармакологични ефекти на талидомида е от най-важно значение за антимиеломното му действие (Kenealy and Prince 2006).

Тератогенността на талидомида изисква стриктно съвместно приложение на два метода на контрацепция при лечение на жени във фертилна възраст, както и редовно проследяване на нивото на чХГТ (Doss 2006). Талидомидът обаче има и множество други и при това често срещани нежелани лекарствени реакции (НЛР) – сънливост, отпадналост, констипация, сухота в устата, задръжка на течности, обриви и сърбеж по кожата (Kenealy and Prince 2006). Седативният ефект определя приемането на Thalidomide да става вечер преди лягане. Неутропенията и хипотиреоидизмът са редки НЛР, но при поява трябва да се мониторира на всеки 3 месеца. Кардиотоксичността също е рядка, но понякога се стига до необходимост от поставяне на пейсмейкър. Периферната невропатия вследствие на аксонална дегенерация е друго добре известно усложнение и е свързано главно с продължителността на лечението, но също и с кумулативната доза на талидомида. Типичната клинична картина при това усложнение се изразява в болезнени предимно дистални парестезии (мравучкане) и/или загуба на чувствителността в областта на краката, а понякога и на ръцете. Често се засягат моторните неврони, а понякога

и проприорецептивната сетивност. Процесът често е необратим (Dispenzieri 2007). С оглед рязкото нарастване на случаите на периферна невропатия след шестия месец се препоръчва при възможност продължителността на лечението с талидомид да се сведе до 6 месеца или да се използват комбинации от ниски дози талидомид с други лекарства. Честотата на венозен тромбоемболизъм (ВТЕ) при самостоятелно приложение на талидомид (3%) не изглежда повишена, но при съчетаване с дексаметазон, антрациклини или лекарства, стимулиращи еритропоезата, достига от 10 до 25% (Kenealy and Prince 2006). За предотвратяване на ВТЕ при различни клинични проучвания са използвани различни средства (ацетилсалицилова киселина, нискомолекулни хепарини, кумаринови антикоагуланти), но засега не може да се определи със сигурност коя е най-подходящата профилактика (Ludwig, Veksac et al. 2010).

Талидомидът вече се използва рутинно при ММ, след множеството публикации демонстриращи ефективността му както като първоначално лечение, така и при рецидиви или при преходно неуспешно лечение с други лекарства (Melchert and List 2007). Например при многоцентрово клинично проучване от трета фаза новодиагностицирани пациенти са били рандомизирани да получат четири 28-дневни курса Dexamethasone по 40 mg/ден в дни 1–4, 9–12 и 17–20, приложен самостоятелно или в комбинация с Thalidomide 200 mg/ден, прилаган ежедневно. Понижение на парапротеина в серума и урината било наблюдавано при 63% от пациентите на комбинирана терапия в сравнение с 41% от пациентите, лекувани само с дексаметазон ($p=0,0017$). Наблюдавана е значителна токсичност, като 17% от пациентите на комбинирана терапия са получили дълбока венозна тромбоза (ДВТ). Друго подобно проучване показва, че средният период без прогресия на заболяването е 22,6 месеца при пациентите на комбинирана терапия и 6,5 месеца при пациентите, лекувани само с дексаметазон (Rajkumar, Rosinol et al. 2008). Комбинацията талидомид/дексаметазон (Thal/Dex) е възприета за начална индукционна терапия и за лечение преди АТХСК. Редица проучвания показват, че тази комбинация е по-ефективен индукционен режим в сравнение с VAD (постигане на ремисия съотв. при 76% и 52% от пациентите). Ето защо VAD вече не се препоръчва като първоначално лечение на ММ. Добавянето на циклофосфамид или антрациклинов антибиотик към Thal/Dex може допълнително да повиши ефективността (Ludwig, Veksac et al. 2010). Самостоятелно приложен, талидомидът постига терапевтичен отговор при 36% от новодиагностицираните пациенти, като средното време до постигане на ремисия е 4,2 месеца (0,7 месеца за комбинацията с дексаметазон) (Cavo, Zamagni et al. 2005).

Добавянето на талидомид към комбинацията МР (Melphalan/Prednisolone), смятана доскоро за „златен” стандарт при пациенти в напреднала възраст и тези, които не могат да понесат високодозова химиотерапия, повишава честотата на постигане на пълна ремисия и удължава периода от време без прогресия на заболяването, но с цената на висока токсичност. Рандомизирани контролирани проучвания при пациенти на възраст между 60-65 и 85 години демонстрират постигане на ремисия при 76-81% от пациентите на МРТ (Melphalan/Prednisolone/Thalidomide) и при 40-47% от пациентите на МР. Главната НЛР е била ДВТ, но е била сведена от 20% до 3% с употребата на нискомолекулен хепарин. Други по-чести усложнения са били неутропения, инфекции, тромбоцитопения и периферна невропатия (Rajkumar and Palumbo 2007; Ludwig, Veksac et al. 2010).

Систематичното обобщение на повече от 30 клинични проучвания от втора фаза при пациенти с рецидив показва, че монотерапията с талидомид постига ремисия при 29,4% от случаите (N=1674) (Glasmacher, Hahn et al. 2006). Средната преживяемост при същото проучване е 14 месеца. Параметри, които повишават шанса за постигане на добър резултат са: млада възраст и ниски нива на ЛДХ и $S\beta_2M$. Използваните дози на Thalidomide в споменатите 30 проучвания варират в границите от 200 до 800 mg на ден, но е известно, че терапевтичен ефект се наблюдава още при 100 mg дневно (Palumbo, Bertola et al. 2004). Съществуващите на този етап данни подкрепят като най-подходяща дозировката от 200 mg/ден. Комбинации с Dexamethasone постигат терапевтичен отговор при около 51% от пациентите с рецидивирал резистентен ММ. Комбинации с конвенционална химиотерапия постигат терапевтичен отговор при до 76% от пациентите (Kastritis, Mitsiades et al. 2007).

Талидомидът е ефективен и като поддържаща терапия. При клинично проучване 597 пациенти, преминали АТХСК, били разпределени в три групи: А – без поддържащо лечение; Б – поддържащо лечение с Pamidronate (90 mg/месец) и В – поддържащо лечение с Thalidomide (100 mg/ден) и Pamidronate (90 mg/месец) (Attal, Harousseau et al. 2006). Пълен или много добър частичен отговор бил постигнат при 55% от пациентите в група А, 57% в група Б и 67% в група В ($p=0,03$). След 3 години без данни за прогресия на болестта били 36% от пациентите в група А, 37% в група Б и 52% в група В ($p=0,009$). Четиригодишната преживяемост била съответно 77%, 74% и 87% ($p=0,04$). Пациентите с del(13) или тези, постигнали много добър отговор след АТХСК, обаче не получили удължаване на ремисията. Началната доза на талидомида в това проучване била 400 mg дневно, като 39% от пациентите прекъснали лечението поради НЛР. Важно е да се от-

бележи, че поддържащото лечение с талидомид не е повишило риска от тромбоемболични усложнения при това проучване, което води до предположението, че тромбогенността на талидомида е най-висока тогава, когато той се използва като индукционно лечение при голям туморен товар или когато се комбинира с други тромбогенни лекарства. Клинично проучване при пациенти след АТХСК, сравняващо поддържаща терапия с Thalidomide и Prednisolone срещу такава само с Prednisolone, демонстрира по-висока обща 3-годишна преживяемост за пациентите лекувани с комбинацията (86% вместо 75%) (Spencer, Prince et al. 2009).

Lenalidomide. Леналидомидът (CC-5013, Revemid, Revlimid™) представлява структурен аналог на талидомида и е синтезиран в средата на 90-те години на XX век (Melchert and List 2007). В сравнение с талидомида леналидомидът има по-висока активност и по-благоприятен профил на токсичност.

Леналидомидът също като талидомида е рацемична смес от два енантиомера – S(-) и R(+). Също се прилага перорално и елиминирането е предимно чрез бъбреците. Употребата му при пациенти с влошен креатининов клирънс изисква повишено внимание. Терминалният полуживот на леналидомида е около 3 часа (Melchert and List 2007). Фармакодинамиката му е сходна с тази на талидомида, но леналидомидът има 50 000 пъти по-висока активност като инхибитор на продукцията на цитокини и 2 000 пъти по-висока активност като стимулатор на пролиферацията на Т-лимфоцитите и продукцията на IL-2 и IFN- γ . За разлика от талидомида, Lenalidomide потиска CD25-положителните Т-лимфоцити с имunosупресорна функция. Има данни, че потиска и остеокластогенезата (Quach, Ritchie et al. 2010). Освен това леналидомидът инхибира сигналния път Ras/Raf/MAPK, повишава експресията на p21, p27 и p15, и намалява нивата на някои антиапоптоични протеини. Така се реализира пряк цитотоксичен ефект (Piazza, Gurrieri et al. 2007; Quach, Ritchie et al. 2010). Леналидомидът не притежава значителна невроседативна активност и не предизвиква констипация (Doss 2006). Дозолимитиращи са неутропенията и тромбоцитопенията. Чести НЛР са умора и мускулна слабост, по-редки са диария и крампи. Потенциалната възможност леналидомидът да притежава тератогенни свойства изисква спазване на правила като тези при талидомида.

През юни 2006 г. леналидомидът е одобрен от FDA за лечение на рецидивирал или рефрактерен ММ в комбинация с дексаметазон (Melchert and List 2007). От юни 2007 г. е одобрен и от ЕМА със същото показание. Две рандомизирани, многоцентрови клинични проучвания от трета фаза (ММ-009 и ММ-010) са сравнили ефектите от комби-

нирано лечение с леналидомид и дексаметазон (Rev/Dex) спрямо дексаметазон и плацебо. И двете проучвания са при пациенти, които са били подложени на поне една предходна терапия. Комбинираното лечение било организирано под формата на 28-дневни цикли, като леналидомидът бил прилаган ежедневно в първите 21 дни от цикъла в дневна доза 25 mg, а дексаметазонът бил прилаган по 40 mg/ден в следните дни от цикъла: от първия до четвъртия, от деветия до дванадесетия и от седемнадесетия до двадесетия. Резултатите показват голямо понижение на концентрацията на парапротеина при 51–53% от пациентите на комбинирано лечение. Съответният процент при пациентите, лекувани само с дексаметазон, е 5,5 пъти по-нисък ($p < 0,0001$). Периодът без прогресия на заболяването при същите две групи е съответно около 56,8 и 20,7 седмици (Dimopoulos, Chen et al. 2009). Неутропения и тромбоцитопения от трета и четвърта степен се наблюдават съотв. при 27% и 17% от пациентите на комбинирано лечение (Melchert and List 2007). Честотата на ДВТ в същата група е средно 7,8%, но варира от 23% при пациентите, на които паралелно с комбинацията е прилаган и еритропоетин, до 5% при останалите. Данни от същото проучване, а и от друго, изучаващо съвместното приложение на Lenalidomide с антрациклини, показват, че профилактиката с ацетилсалицилова киселина значително намалява риска от тромботични усложнения. При клинично проучване от II фаза е била изучавана ефективността на леналидомида като монотерапия при рецидивирал или рефрактерен ММ (Kenealy and Prince 2006). Използвани са две различни дозировки: 15 mg два пъти на ден и 30 mg веднъж дневно. Резултатите показват задоволителна активност и поносимост. Приемът на Lenalidomide два пъти дневно обаче се отличава с по-голяма честота на НЛР. Интересно е, че не се наблюдава понижена успеваемост на лечението с леналидомид при пациентите с развита резистентност към Thalidomide или Bortezomib (Richardson, Blood et al. 2006). Комбинирането на Rev/Dex с Dexamethasone или с Cyclophosphamide при пациенти с рецидивирал и резистентен ММ показва обещаващи резултати (Laubach, Mahindra et al. 2009).

Клинично проучване от II фаза на комбинацията Rev/Dex като индукционна терапия преди АТХСК при ново-диагностицирани пациенти с ММ показва висока честота на постигане на терапевтичен отговор – 91% (Rajkumar, Nauman et al. 2005). Използването на по-ниски дози Dexamethasone (общо 160 mg на курс вместо общо 480 mg) води до по-голяма едногодишна обща преживяемост – 96% вместо 87% (Rajkumar, Jacobus et al. 2010). Клинично проучване от I/II фаза на комбинацията Melphalan/Prednisone/Lenalidomide (MPR) при възрастни ново-диагностицирани пациенти с ММ, неподлежащи на АТХСК, показва много обещаващи резултати – постигане на терапевтичен отговор при

81%, пълна ремисия при 24% от пациентите и двугодишна преживяемост от 90,5% (Palumbo, Falco et al. 2009). При това наличието на t(4;14) или del(13) не влошава значимо успеваемостта на лечението. del(17) обаче се отразява негативно (Ludwig, Veksac et al. 2010). Основните НЛР са тежка неутропения, тромбоцитопения, дълбока венозна тромбоза (ДВТ) и кожни обриви. Профилактиката с ацетилсалицилова киселина значително намалява риска от тромботични усложнения (Palumbo, Falco et al. 2007). Няколко проучвания демонстрират голяма ефективност на леналидомида и при миелодиспластичен синдром (Melchert and List 2007).

Pomalidomide (CC-4047, Actimid™) е друго производно на талидомида, много близко по фармакологични свойства до леналидомида. CC-4047 има по-дълъг полуживот – около 7 часа (Melchert and List 2007). Клинично проучване от I фаза показва, че е добре поносим при дози до 5 mg дневно (Stewart 2009). Започнато е клинично проучване от II фаза на комбинацията Pomalidomide/Dexamethasone (Pom/Dex) при пациенти с рецидивирал и рефрактерен ММ, включително такива с развита резистентност към талидомид, леналидомид или бортезомиб. Pomalidomide се прилага в доза 2 mg/ден, а дексаметазонът – по 40 mg веднъж седмично. Наблюдава се терапевтичен резултат при 63% от пациентите, като 5% са получили пълна ремисия. Основната НЛР е миелосупресия (Lacy, Nauman et al. 2009).

1.6.2. Протеазомни инхибитори

Bortezomib. Бортезомибът (PS-341, Velcade®) е първото лекарствено вещество от нова фармакологична група – тази на протеазомните инхибитори (Kenealy and Prince 2006). Той инхибира β -субединицата на 20S-компонента на 26S-протеазомата и по-точно частта от нея, която проявява химотрипсино-подобна активност (означавана като $\beta 5$) (Nencioni, Grunebach et al. 2007). Високи концентрации бортезомиб обаче могат да инхибират и участъците с каспазо-подобна и трипсино-подобна активност (означавани съответно като $\beta 1$ и $\beta 2$). Функцията на протеазомата е да разгражда убиквитинилираните протеини. Убиквитинът представлява къса полипептидна верига от 76 аминокиселинни остатъка (Landis-Piwowar, Milacic et al. 2006). Ковалентното му свързване с протеините е сигнал за тяхното разграждане. Повече от 80% от протеините в еукариотните клетки могат да бъдат подложени на подобна деградация (Nencioni, Grunebach et al. 2007). Сред тях са циклини, циклин-зависими кинази, инхибитори на циклин-зависи-

мите кинази, I κ B, p53, W α x, C-fos, C-jun, N-MYC, β -катенин, SNAIL, HIF1- α и др. С инхибиране на протеазомата разграждането на тези протеини се потиска. Някои неоплазми отговарят на такова въздействие с отключване на апоптоза, но засега няма точно механистично обяснение на този феномен. Смята се, че от най-голямо значение е засягането на деградацията на I κ B и последващото намаляване на активността на NF- κ B и съответно понижен синтез на антиапоптотични (c-FLIP, IAP1/2 и Bcl-2) и ангиогенни фактори. Част от другите предполагаеми механизми на действие на протеазомните инхибитори са: стабилизиране на p53 и натрупването му; изместване на баланса между апоптотичните и антиапоптотичните протеини; нарушаване на обмяната на циклините; нарушаване на контрола върху проапоптотичните сигнали, задействани от TRAIL; предизвикване на стресово въздействие върху ендоплазмения ретикулум чрез натрупване на протеини с неправилна третична и четвъртична структура; повишаване на вътреклетъчната концентрация на реактивни кислородни радикали и индуциране на оксидативен стрес (Nencioni, Grunebach et al. 2007). Разнообразието от протеини, които се разграждат чрез протеазомата, определя и наличието на „контрапродуктивни” ефекти на протеазомните инхибитори и в частност на бортезомиба – натрупване в клетката на антиапоптотични протеини и на Hsp90, който е шаперон, подкрепящ функциите на IL-6 и IGF-R1. Крайните ефекти от действието на бортезомиба са: стимулиране на апоптозата (и външния и вътрешния път); нарушаване на адхезивността на МП; потискане на сигнални пътища, важни за пролиферацията и оцеляването на туморните клетки; антиангиогенен ефект; инхибиране на репарацията на ДНК. Бортезомибът има *in vitro* и *in vivo* активност срещу някои неоплазми, между които е и ММ (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Интересен е фактът, че терминално-диференцираните Ig-секретиращи нормални плазмоцити са с нарушена протеазомна функция и са склонни към апоптоза. Това вероятно е механизъм, контролиращ продължителността на живота на плазмоцитите. Причината за по-ниската токсичност на протеазомните инхибитори към нормалните клетки не е изяснена, но има предположение, че нормалните клетки могат да компенсират протеазомната инхибиция чрез използване на алтернативни пътища (напр. лизозомни) за разграждане на протеините (Chauhan, Hideshima et al. 2006). Освен това аномалният синтез на протеини в туморните клетки (напр. синтезът на имуноглобулини от МП) прави клетките силно зависими от функцията на протеазомите да разграждат протеините с неправилна третична и четвъртична структура. Има данни, че Bortezomib може да потиска остеокластите и да стимулира диференциацията и активността на остеобластите (Kastritis, Mitsiades et al. 2007; Mitsiades, McMillin et al. 2007).

Най-честите НЛР към Bortezomib са: различни цитопении (най-вече тромбоцитопения – честота около 33%); периферна невропатия (36%), която може да наложи прекратяване на лечението или преминаване към по-ниски дози; стомашно-чревни оплаквания (гадене, повръщане и диария); реактивация на *Varicella-zoster virus* (13%); ортостатична хипотония; летаргия и отпадналост; миалгия; обрив; диспнея; замъглено зрение (Kenealy and Prince 2006). Докладвани са случаи на синдром на туморния разпад в началото на терапията – рядко срещано явление при лечение на ММ с други лекарства. Плазмената концентрация на бортезомиб може да се повлияе от инхибитори и индуктори на CYP3A4 и CYP2C19. Продължителното въздействие с протеазомни инхибитори може да доведе до развитие на резистентност към действието им (Piazza, Gurreri et al. 2007). Изучават се възможностите за противодействие на този процес чрез съвместното използване на Bortezomib с някои други вещества като камптотециновия аналог СРТ-11, РК11195 (антагонист на митохондриалния периферен бензодиазепинов рецептор), TRAIL и др.

АРЕХ е първото клинично проучване на Bortezomib от трета фаза (Kenealy and Prince 2006). В него са били включени 669 пациенти с ММ и история за поне едно предходно лекарствено лечение. Средната възраст на пациентите била 61–62 години. Те били рандомизирани в две групи – А и Б. Група А били подложени на индуцираща терапия с бортезомиб, състояща се от осем 21-дневни цикъла. Бортезомибът бил прилаган в доза $1,3 \text{ mg/m}^2$ i.v. на първия, четвъртия, осмия и единадесетия ден от всеки цикъл. След това пациентите били оставени на поддържаща терапия с по-ниска доза бортезомиб веднъж седмично. Група Б били лекувани с дексаметазон, като терапията била структурирана в 28-дневни цикли. В началото пациентите получавали по 40 mg дексаметазон на ден в следните дни от цикъла: от първия до четвъртия, от деветия до дванадесетия и от седемнадесетия до двадесетия. След това преминали на поддържаща терапия – 4 поредни дни по 40 mg дексаметазон веднъж месечно, общо за 5 месеца. Общата честота на постигане на ремисия (пълна или частична) била 38% при група А и 18% при група Б. Средният период от време без прогресия на заболяването бил съответно 6,22 и 3,49 месеца, а едногодишната преживяемост – съответно 80% и 66%. Към лечението на 74 пациенти от група А бил добавен дексаметазон (по 20 mg в деня преди и в деня след всяко приложение на бортезомиб). Така допълнителни 18% от пациентите постигнали частична ремисия. Резултатите от това проучване послужиха като основа за регистрацията на Bortezomib като лекарствено вещество в много страни. У нас е регистриран от октомври 2004 г. и е показан като монотерапия за лечение на ММ при пациенти, които

са получили поне един вид предходно лечение и вече са били подложени или са неподходящи за костно-мозъчна трансплантация. Последващи клинични проучвания при пациенти с рецидивирал ММ показаха много добра ефективност при съвместно приложение на Bortezomib с антрациклинови антибиотици, алкилатори, талидомид или леналидомид, с или без кортикостероиди (Kastritis, Mitsiades et al. 2007; Laubach, Mahindra et al. 2009).

Налични са и данни от клинични проучвания от III фаза за ефективността на Bortezomib като първоначална терапия, приложен самостоятелно или в комбинация с дексаметазон (Vel/Dex). Честотата на постигане на терапевтичен отговор е от порядъка на 83–88% за комбинацията. Тази комбинация позволява успешно последващо изолиране на стволови клетки. Сравнен с талидомид, бортезомибът има по-добър ефект по отношение на мобилизацията на стволови клетки, докато след Thalidomide добивът на CD34+ намалява. Има данни, че комбинацията Vel/Dex е по-добра от VAD като индукционна терапия преди АТХСК (Rajkumar and Palumbo 2007; Ludwig, Beksac et al. 2010). С още по-добър ефект се очертават комбинациите Bortezomib/Thalidomide/Dexamethasone (VTD) и Bortezomib/Lenalidomide/Dexamethasone (VRD). Провеждат се проучвания на терапевтични схеми, съчетаващи бортезомиб с антрациклини, като предварителните данни показват добър ефект (Ludwig, Beksac et al. 2010).

Комбинацията Melphalan/Prednisone/Bortezomib (MPV) е прилагана при възрастни новодиагностицирани пациенти с ММ, неподлежащи на АТХСК. Постигнатата тригодишна преживяемост е 72%, а в контролната MP-група – 59%. Наличието на IgH-транслокации или del(13) не се отразява на резултатите от лечението (Rajkumar and Palumbo 2007). Комбинираното лечение с бортезомиб и 17-AAG (инхибитор на Hsp90) повлиява благоприятно пациенти с развита резистентност към действието на бортезомиб (Joazeiro, Anderson et al. 2006). Учудващо, данни от клинични проучвания от I фаза на комбинацията Bortezomib/Lenalidomide показват по-ниска честота на възникване на периферна невропатия в сравнение със самостоятелно приложен бортезомиб.

Резултати от *in vitro* изследвания показват, че бортезомибът преодолява резистентността към традиционни лекарства като алкилатори и антрациклинови антибиотици и сенсibiliзира туморните клетки към γ -лъчение, ритуксимаб, хистон-деацетилазни (HDAC) инхибитори, фарнезилтрансферазни инхибитори, тирозинкиназни инхибитори и др. (Nencioni, Grunebach et al. 2007) Има данни и за синергизъм в действието на бортезомиба и дексаметазона. Очакват се и данни от клинични проучвания на различни комбинации.

Салиноспорамид А (NPI-0052) е нов протеазомен инхибитор, изолиран от *Salinispora tropica* – новооткрит актиномицет, живеещ в моретата (Chauhan, Hideshima et al. 2006). NPI-0052 има структурна близост с веществото омуралид, което също е протеазомен инхибитор и е активен метаболит на лактацистина, изолиран от някои видове *Streptomyces*. За разлика от бортезомиба и омуралида, NPI-0052 се свързва необратимо с треониновите остатъци в активните центрове на β -субединицата на 20S-компонента на 26S-протеазомата. NPI-0052 се свързва предимно с $\beta 2$ и $\beta 5$ и ги инхибира при много по-ниска концентрация от бортезомиба (Chauhan, Catley et al. 2005). Афинитетът му към $\beta 1$ обаче е по-нисък. Инхибиращият ефект на NPI-0052 спрямо трите основни активни центъра на β -субединицата продължава до 7 дни. NPI-0052 и Bortezomib оказват инхибиращо влияние и върху имунопротеазомите (Chauhan, Hideshima et al. 2006). NPI-0052 потиска по-силно активирането на NF- κ B и синтеза на IL-6 в сравнение с Bortezomib. NPI-0052 предизвиква апоптоза при МП, независимо от това дали са чувствителни или резистентни към бортезомиб. Предполага се, че причината за това е едновременното инхибиране и на трите основни активни центъра, което не дава възможност някой от центровете да компенсира нарушените функции на останалите. NPI-0052 се нуждае от каспаза-8, за да индуцира апоптоза, докато бортезомибът се нуждае едновременно от функциониращи каспаза-8 и каспаза-9, както и от Вах и Вак. Съответно Вc1-2 затруднява действието му. Различията в ефектите на NPI-0052 и бортезомиб стигат дотам, че при съвместното им приложение върху МП се наблюдава синергизъм (Chauhan, Catley et al. 2005). Токсичността на NPI-0052 спрямо нормалните лимфоцити е по-ниска в сравнение с тази на бортезомиба. NPI-0052 има изявена противотуморна активност при модел на човешки миелом присаден на мишки и не предизвиква значителни нежелани ефекти. Предварителни данни от клинично проучване от I фаза показват добра поносимост. Наблюдавана е обаче нефротоксичност (Laubach, Mahindra et al. 2009).

Carfilzomib (PR-171) е друг нов протеазомен инхибитор и е синтетично производно на епоксомицина (Joazeiro, Anderson et al. 2006). Carfilzomib може да се свързва с протеини само при наличие на N-терминален треонин – така възможността му за свързване е ограничена само до протеазомата. PR-171 инхибира необратимо участъка с трипсиноподобна активност ($\beta 2$). Клинични проучвания от II фаза при пациенти с рецидивирал и рефрактерен ММ показват постигане на ремисия в 18% или 57% от случаите, в зависимост от това дали преди това са били лекувани с Bortezomib или не. Най-сериозните

НЛР са анемия (37%), тромбоцитопения (26%) и развитие на остра бъбречна недостатъчност (2%). Периферна невропатия е наблюдавана само при 2,2% от пациентите (Laubach, Mahindra et al. 2009; Stewart 2009).

1.6.3. Нови алкилатори

Bendamustine (Ribomustin®) е алкилатор, който има структурно подобие с пуриновите аналози. Установено е, че не възниква кръстосана резистентност между Bendamustine и другите алкилиращи лекарства. Предимство е по-ниската токсичност по отношение на миелоидната хемопоеза. Регистриран е за приложение при лимфоми, карцином на млечната жлеза и ММ. Бендамустинът се прилага като краткотрайна венозна инфузия в доза 50–60 mg/m² от 3 до 5 последователни дни всяка трета или четвърта седмица. Рандомизирано проучване от III фаза показва по-голяма честота на постигане на пълна ремисия при новодиагностициран ММ с комбинацията Bendamustine/Prednisolone отколкото с МР – съотв. 32% и 13%. Времето без прогресия на заболяването е съотв. 14 и 10 месеца (Ponisch, Mitrou et al. 2006). Трябва да се има предвид обаче, че в това проучване е използвана нестандартна дозировка на Melphalan. В момента се провеждат проучвания на Bendamustine в комбинация с Vortezomib, както и с Thalidomide и Prednisolone (Stewart 2009).

1.6.4. Средства, инхибиращи функциите на растежни фактори или на рецептори за растежни фактори

CNTO 328 е моноклонално антитяло, което се свързва с **IL-6** и го блокира. Сенситивизира МП към действието на Vortezomib и Dexamethasone (Voorhees, Chen et al. 2007; Voorhees, Chen et al. 2009). CNTO 328 има добра поносимост. В ход е клинично проучване от II фаза на комбинация с Vortezomib при пациенти с рецидивирал или рефрактерен ММ (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

Sant7 е суперантагонист, който се свързва с **рецептора за IL-6** без да го активира. Индуцира апоптоза в IL-6-зависими миеломни клетки и ги сенситивизира към действието на дексаметазона (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

Bevacizumab (Avastin®) е хуманизирано моноклонално антитяло, което се свързва с VEGF и блокира функциите му. Първоначално е регистриран за лечение на метастазирал коло-ректален карцином. В ход са проучвания за ефектите му при ММ, в комбинация с бортезомиб или с леналидомид и дексаметазон (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

Инхибитори на VEGFR. Тук спадат Vatalanib (PTK787/ZK 222584), GW654652, Semaxanib (SU5416) и Pazopanib (GW786034B) (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Те потискат пролиферацията и миграцията на МП, както и продукцията на IL-6 в костно-мозъчната микросреда. PTK787 инхибира селективно VEGFR2, но има известна активност и срещу VEGFR1. PTK787 потенцира противомиеломното действие на дексаметазона. Започнато е клинично проучване от I/II фаза на PTK787 при пациенти с рецидивирал ММ (Chng, Lau et al. 2005). MTD на PTK787 при пациенти с напреднал колоректален рак е 1 250 mg дневно, а най-честата му дозолIMITИраща токсичност е замаяност (Morgan, Krishnan et al. 2006). SU5416 е селективен инхибитор на VEGFR2 (Thomas, Trarbach et al. 2007). При клинично проучване от II фаза SU5416 не е довел до обективна терапевтична полза въпреки постигнато понижение на плазмената концентрация на VEGF.

Инхибитори на IGF-1R. Експерименти с миеломни клетъчни линии и миши модели на ММ демонстрират възможността за потискане на пролиферацията на МП и ангиогенезата чрез антитела (напр. IMC-A12) или IGF-1-подобен пептид, блокиращи IGF-1R, както и чрез NVP-ADW742 и пикроподофилин (инхибитори на киназната активност на IGF-1R) (Piazza, Gurrieri et al. 2007; Kastritis, Charidimou et al. 2009). Тези подходи постигат намаляване на туморния товар и нивото на серумния парапротеин при миши модели на ММ.

Инхибитори на FGFR3. FGFR3 е рецептор с тирозинкиназна активност, чийто ген е мутирал при около 15% от пациентите с ММ (Morgan, Krishnan et al. 2006). Към инхибиторите на FGFR3 спадат нискомолекулни вещества като CHIR-258, SU5402, SU10991, PD173074, AB1010 и PKC412, а също и неутрализиращото антитяло PRO-001 (Piazza, Gurrieri et al. 2007; Kastritis, Charidimou et al. 2009). При FGFR3-положителни миеломни клетъчни линии, те потискат фосфорилирането на ERK 1/2 и пролиферацията, предизвикват диференциация и апоптоза. За CHIR-258, SU5402 и SU10991 има данни за ефект и при миши модели на ММ. В ход са клинични проучване от I фаза на CHIR-258 и AB1010 при пациенти с ММ (Morgan, Krishnan et al. 2006; Kastritis, Charidimou et al. 2009).

SD-208 е инхибитор на киназната активност на **TGF β -RI** (рецептор за TGF β) (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Като такъв SD-208 понижава секрецията на IL-6 и VEGF от СКМК и потиска пролиферацията на МП, индуцирана от адхезията им към СКМК.

1.6.5. Фарнезилтрансферазни инхибитори

Фарнезилтрансферазните инхибитори (ФТИ) потискат ковалентното свързване на фарнезилни остатъци към Ras и така пречат на активирането му и съответно на активирането на MAPK (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Ras обаче може да се активира и чрез ензима геранил-геранилтрансфераза, който не се инхибира от ФТИ. ФТИ, които се изучават в момента, са Tipifarnib (R11577, Zarnestra®), Lonafarnib (SCH66336), FTI-277 и др. Те инхибират пролиферацията на МП и индуцират апоптоза при миеломни клетъчни линии, резистентни към конвенционални цитостатици (Chng, Lau et al. 2005). Противомиеломната им активност обаче не корелира с инхибирането на фарнезилтрансферазата и наличието на мутации в Ras. Има данни, че **Tipifarnib** потиска сигналните пътища PI3K/AKT и JAK/STAT при МП и че активира Вах и вътрешния път на апоптозата (Piazza, Gurrieri et al. 2007). При клинично проучване на типифарниб от II фаза е постигнато стабилизиране на 64% от общо 43 пациенти с напреднал ММ и интензивно предходно лечение (Chng, Lau et al. 2005). Интервалът от време до прогресиране на болестта при тези пациенти е бил средно 4 месеца, при индивидуални стойности от 2 до 26 месеца. Използваната дозировка е 300 mg два пъти на ден, като след всеки 3 седмици непрекъснато лечение е правена едноседмична почивка. Четирима от пациентите са получили понижение на серумния парапротеин в порядък от 25% до 49%. Терапията е била много добре поносима. Най-честата НЛР е била умора (66%) (Armand, Burnett et al. 2007). Други наблюдавани НЛР са диария, гадене, невропатия, анемия и тромбоцитопения. Хематологичната токсичност не е била значителна. Типифарнибът е показал обещаващи резултати и при остра миелоидна левкемия (ОМЛ) и миелодиспластичен синдром. Наблюдаван е синергизъм *in vitro* при комбинирането на Bortezomib с ФТИ като Tipifarnib и Lonafarnib (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

1.6.6. Хистон-деацетилазни инхибитори

Хистон-деацетилазните инхибитори (ХДАИ) потискат пролиферацията и предизвикват диференциация и апоптоза при различни видове туморни клетки, включително МП (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Към ХДАИ спадат Vorinostat (субероиланилидхидроксамова киселина, SAHA, Zolinza®), Depsipeptide, LAQ824, Panobinostat (LBH589), Belinostat (PXD101), KD5170, MS275, CI994 и Tubacin (Kastritis, Charidimou et al. 2009). Освен ефектите си върху МП, те потискат продукцията на IL-6 от страна на СКМК. ХДАИ понижават активността на агрезомния път на разграждане на клетъчни протеини, което обуславя синергистичните им ефекти с Bortezomib (Hideshima and Anderson 2007).

Vorinostat е регистриран от FDA през 2006 г. с показание кожни прояви при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом. Вориностатът инхибира хистондеацетилази от I клас (HDAC1, HDAC2 и HDAC3) и II клас (HDAC6). В резултат на това се повишава експресията на p21^{WAF1}, p53 и голям брой проапоптотични протеини, дефосфорилира се Rb и се отключва апоптоза. Интересно е, че Vorinostat индуцира фрагментация на PARP без да активира каспазите (Hideshima and Anderson 2007). Повишава чувствителността на МП към Bortezomib, Thalidomide и Dexamethasone (Kastritis, Charidimou et al. 2009). Има обещаващи данни от няколко проучвания от I фаза, в които Vorinostat (самостоятелно или с други лекарства) е прилаган при пациенти с напреднал ММ. В ход са проучвания от II и III фаза на комбинации с бортезомиб (Piazza, Gurrieri et al. 2007; Laubach, Mahindra et al. 2009; Stewart 2009). Най-честите сериозни НЛР, които предизвиква са белодробна емболия (4,7%) и анемия (2,3%).

LAQ824 е 200 пъти по-активен от Vorinostat. IC₅₀ при миеломни клетки *in vitro* е от порядъка на 100 nM. Показал е ефективност и в миши модел на ММ. За разлика от Vorinostat активира каспазите (Hideshima and Anderson 2007).

Panobinostat (LBH589) има сходни свойства с LAQ824, но е по-активен от него. В ход е клинично проучване от II фаза при пациенти с ММ. Сред сериозните НЛР влизат различни цитопении (Hideshima and Anderson 2007).

Belinostat (PXD101) има не само пряк антимиеломен ефект, но може и да инхибира остеокластогенезата. Потенцира ефектите на бортезомиба (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

1.6.7. Инхибитори на Hsp90

Geldanamycin (GA) и **Tanespimycin** (17-AAG, 17-алиламино-17-деметоксигелданамицин) са инхибитори на шаперона Hsp90, локализиран в цитозола, и на неговия хомолог Grp94, локализиран в ЕПР (Sydor, Normant et al. 2006). GA и 17-AAG потискат експресията на рецепторите за IGF-1 и IL-6, понижават нивата на Akt, Raf, IKK, FLIP, XIAP и cIAP и потискат активирането на NF-κB и теломеразата (Mitsiades, Mitsiades et al. 2002). В резултат, GA и 17-AAG индуцират апоптоза при различни миеломни клетъчни линии, включително такива резистентни на дексаметазон, антрациклини, талидомид и бортезомиб. 17-AAG е показал ефективност и при миши модел на MM и при пациенти с MM в клинично проучване от I фаза (Morgan, Krishnan et al. 2006). Проучване от II фаза на комбинация с бортезомиб при пациенти с рецидивирал и рефрактерен MM показва постигане на терапевтичен резултат при 44% от пациентите, като повече от половината от тях са били резистентни към Bortezomib (Kastritis, Charidimou et al. 2009). В ход е проучване от III фаза (Laubach, Mahindra et al. 2009). Независимо от предимствата си пред GA по отношение на токсичността, 17-AAG има един съществен недостатък – много малка разтворимост във вода, която налага употребата на токсични органични разтворители като ДМСО или алергенни емулгатори като Cremophor (Sydor, Normant et al. 2006). **IPI-504** е хидрохионна форма на 17-AAG и е много добре разтворим във вода. Всъщност при физиологични условия IPI-504 и 17-AAG могат взаимно да се превръщат и при инжектиране на което и да е от двете вещества се установява равновесие за по-малко от 5 минути. Хидрохионната форма (IPI-504) има около 2 пъти по-голям афинитет към Hsp90 в сравнение с хионната форма (17-AAG). Открит е синергизъм в действието на IPI-504 и бортезомиб. IPI-504 е във втора фаза на клинично проучване при пациенти с MM. **17-DMAG** е друг представител, който също е водно-разтворим (Hideshima and Anderson 2007). **ВПВ021** е първият инхибитор на Hsp90 с добра бионаличност след перорално приложение и вече е в първа фаза на клинично проучване (Sydor, Normant et al. 2006).

1.6.8. Алкилфосфохолини, куркумин и арсенови производни

Тези въпроси са разгледани подробно по-нататък, съотв. в глави I.2, I.3 и I.4.

1.6.9. Други

Elotuzumab (HuLuc63) е моноклонално антитяло срещу **CS1** (гликопротеин, който обикновено е експресиран на повърхността на МП). Предклиничните проучвания свидетелстват за висока антимиеломна активност и синергизъм с дексаметазон. В ход са клинични проучвания на HuLuc63 в комбинация с Bortezomib и в комбинация с Lenalidomide/Dexamethasone (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

Milatuzumab е антитяло срещу CD74 – мембранен протеин, експресиран при много хематологични неоплазми. При клинично проучване от I фаза при пациенти с ММ е наблюдавана добра поносимост, а при някои пациенти и стабилизиране на състоянието (Berkova, Tao et al. 2010).

TRAIL/Apo2L (TNF-сроден апоптозо-индуциращ лиганд/апоптозен лиганд 2) има особеното свойство да индуцира апоптоза в туморните, но не и в нормалните клетки. Той предизвиква апоптоза и при МП, независимо от това дали са резистентни към цитостатици или не (Piazza, Gurrieri et al. 2007). TRAIL/Apo2L значително намалява туморния товар при миши модел на ММ. Доксорубицинът повишава експресията на TRAIL-R2 (рецептор за TRAIL/Apo2L; известен и като DR5) и синергистично потенцира действието на TRAIL/Apo2L върху МП. Синергизъм е установен и при комбиниране на TRAIL/Apo2L с бортезомиб или леналидомид (Mitsiades, Mitsiades et al. 2002). **Maratumumab (HGS-ETR1)** и **Lexatumumab (HGS-ETR2)** са моноклонални антитела с агонистична активност спрямо съответно TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5) (Menoret, Gomez-Bougie et al. 2006). Предимства на тези антитела са по-дългият им плазмен полуживот в сравнение с TRAIL/Apo2L и неинхибирането им от остеопротегерин, който се среща в завишено количество в плазмата на пациенти с ММ. HGS-ETR1 и HGS-ETR2 предизвикват апоптоза при миеломни клетъчни линии и МП изолирани от пациенти. Антитялото HGS-ETR1 е ефективно срещу по-голям брой миеломни клетъчни линии и в повечето случаи при по-ниски концентрации в сравнение с HGS-ETR2. Клинични проучвания от I фаза показват, че Maratumumab и Lexatumumab могат да бъдат прилагани безопасно в доза 10 mg/kg i.v. на всеки две седмици (Tolcher, Mita et al. 2007; Wakelee, Patnaik et al. 2010). Най-честите НЛП са отпадналост, треска и миалгия. В ход са проучвания от II фаза при различни неоплазми.

Sirolimus (Rapamycin), Temsirolimus (CCI-779) и **Everolimus (RAD001)** са инхибитори на mTOR – серин/треонин-киназа, която регулира транскрипцията, пролиферация-

та и преживяемостта. Те повишават експресията на p27^{Kip1} и понижават нивата на c-мус и на циклините от тип D, като така потискат пролиферацията и индуцират апоптоза (Hideshima and Anderson 2007). Установено е, че имат антимиеломна активност и участват в синергистични взаимодействия с Dexamethasone, Lenalidomide и Tanespimycin (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

Инхибитори на p38 MAPK. Сигналната трансдукция чрез p38 MAPK активира синтеза на редица провъзпалителни цитокини, включително IL-1 β , IL-6 и TNF, имащи ключово значение при ММ. **SCIO-469** е инхибитор на p38 MAPK и като такъв потиска пролиферацията и преживяемостта на МП в костно-мозъчната микросреда, макар и в не особено голяма степен (Morgan, Krishnan et al. 2006). От важно значение обаче е фактът, че SCIO-469 противодейства на повишената експресия на Hsp27, която е важен механизъм за развитие на резистентност към бортезомиб (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Така SCIO-469 възвръща чувствителността на резистентните към бортезомиб МП и потенцира способността на бортезомиба да предизвиква апоптоза при чувствителни МП. Освен това инхибирането на p38 MAPK прави дендритните клетки по-способни да задействат имунен отговор срещу МП и потиска остеокластогенезата. SCIO-469 се проучва както като монотерапия, така и в комбинация с бортезомиб, при пациенти с рецидивирал и рефрактерен ММ. **BIRB-796** е друг инхибитор на p38 MAPK, който засега е на етап *in vitro* изследвания (Yasui, Hideshima et al. 2007). Той също потенцира действието на Bortezomib и 17-AAG.

Инхибитори на MEK1/2. AZD6244 инхибира двете изоформи на киназата MEK и индуцира апоптоза в МП. Освен това потиска отделянето на остеокласт-активиращи фактори от МП (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

PS-1145 е синтетичен селективен инхибитор на ИКК, който също оказва антипролиферативен и проапоптотичен ефект върху МП (Piazza, Gurrieri et al. 2007). Засега е в етап на *in vitro* изследвания.

Seliciclib (CYC202, R-росковитин) е инхибитор на циклин-зависимите кинази. Селициклибът предизвиква дефосфорилиране и инхибиране на РНК-полимераза II, което води до понижаване на нивото на протеините с къс полуживот, като Mcl-1 (Morgan, Krishnan et al. 2006). Понижаването на Mcl-1 само по себе си е достатъчно да предизвика апоптоза на МП.

Oblimersen (G3139, Genasense®) е антисенс-олигонуклеотид, насочен срещу иРНК за синтез на Bcl-2. Той прониква достатъчно добре в МП, понижава нивото на Bcl-2 и сенсibiliзира МП към лекарства предизвикващи апоптоза, като дексаметазон и доксорубин (Chng, Lau et al. 2005). При клинично проучване от II фаза Oblimersen бил приложен съвместно с VAD при 10 пациенти, получили интензивна предходна терапия. При четирима пациенти бил наблюдаван частичен терапевтичен отговор, а при още трима – минимален такъв. При това петима от общо седемте повлияни пациента били с история за резистентност към VAD. При друго подобно проучване G3139 бил комбиниран с дексаметазон и талидомид при 33 пациенти. Наблюдавани са 2 пълни ремисии, 4 почти пълни ремисии, 12 частични ремисии и 6 минимални отговора (Badros, Goloubeva et al. 2005). Средната продължителност на ремисиите била 13 месеца, а преживяемостта 17,4 месеца. Проучване от III фаза на комбинацията Oblimersen/Dexamethasone при пациенти с рецидивирал и рефрактерен миелом обаче не показва клинична ефективност (Chanan-Khan, Niesvizky et al. 2009).

ABT-737 е ВНЗ-миметик. Свързва се с антиапоптотичните протеини Bcl-2 и Bcl-X_L и ги инактивира, като така индуцира апоптоза. Антимиеломният му ефект *in vitro* не се нарушава от присъствието на IL-6 или VEGF. Участва в синергистични взаимодействия с Bortezomib, Melphalan и Dexamethasone (Kastritis, Charidimou et al. 2009).

2-метоксиестрадиолът (2-МЕ) е естествен метаболит на естрадиола, който проявява изявена противотуморна и антиангиогенна активност (Chng, Lau et al. 2005). Афинитетът му към естрогеновите рецептори е много нисък и точният му механизъм на действие не е известен. 2-МЕ преодолява протективния ефект на IL-6 и IGF-1, понижава секрецията на VEGF и IL-6 от СКМК и предизвиква апоптоза на МП. 2-МЕ действа синергистично с дексаметазон, арсеник, талидомид и бортезомиб (Gao and Hou 2005; Zhou, Hou et al. 2008). При клинично проучване от II фаза при 60 пациенти с рецидивирал ММ монотерапия с 2-МЕ не е постигната ремисия при нито един от пациентите, но е наблюдавано значително забавяне на прогресията на болестта (Rajkumar, Richardson et al. 2007).

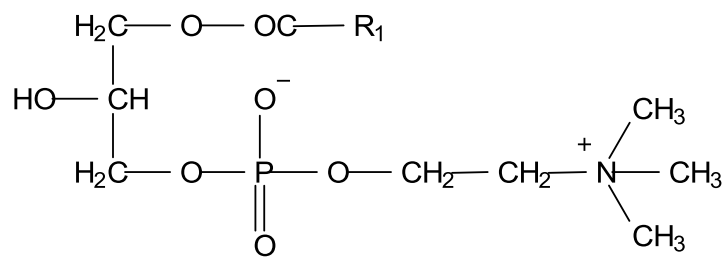
1.7. Заключение

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. Всичко това налага продължаване на усилията за откриване и разработване на нови вещества с потенциално по-голяма антимиеломна активност и по-ниска токсичност.

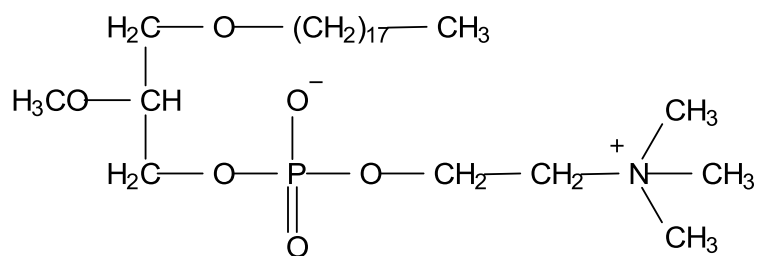
2. Алкилфосфохолини

2.1. История

След като било установено, че лизолецитинът стимулира фагоцитозата при макрофагите, била предложена хипотезата, че лизофосфолипидите са физиологични медиатори на имунните реакции. Това предположение послужило като основание за синтез на вещества с подобна структура, с надеждата, че тези от тях, които имат по-бавен метаболизъм, биха могли да се използват като имуномодулатори. Така 2-О-метил-1-О-октадецил-глицерол-3-фосфохолинът (ЕТ-18-ОСН₃, Edelfosine) станал лидерна структура на този нов клас съединения – алкиллизофосфолипиди (Eibl, Arnold et al. 1967).



ЛИЗОЛЕЦИТИН



ЕТ-18-ОСН₃ (Edelfosine)

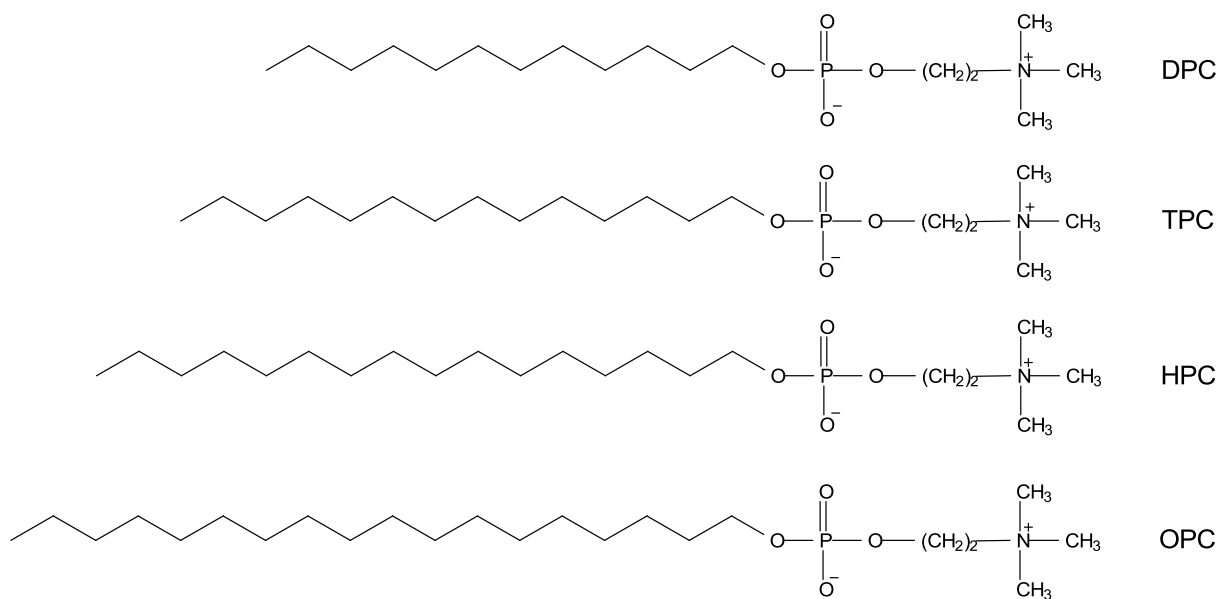
Резултатите от проведените с тях фармакологични изследвания показали, че те проявяват концентрационно зависим и селективен цитотоксичен ефект върху човешки левкемични клетки *in vitro* (Andreesen, Modolell et al. 1978). По-късно било установено, че цитотоксичността на алкиллизофосфолипидите е правопрпорционална на субстратната им специфичност към фосфолипаза С и/или D. Чрез тези изследвания се стигнало до заключението, че глицероловият остатък не е задължителен структурен елемент за про-

тивотуморното действие на молекулата. Хексадецилфосфохолинът (HPC, Miltefosine) бил идентифициран като лидерна структура на алкилфосфохолините (АФХ) – нов клас съединения с противотуморна и антипротозойна активност (Croft, Neal et al. 1987; Fleer, Unger et al. 1987).

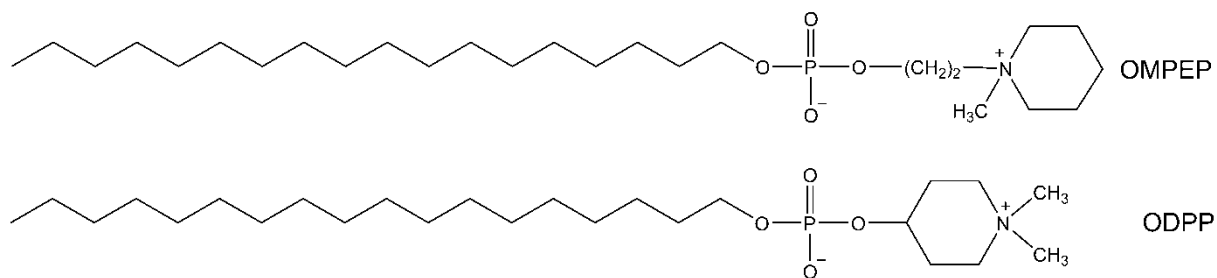
2.2. Химична структура и класификация

Алкилфосфохолините могат да се разделят на три основни групи (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998):

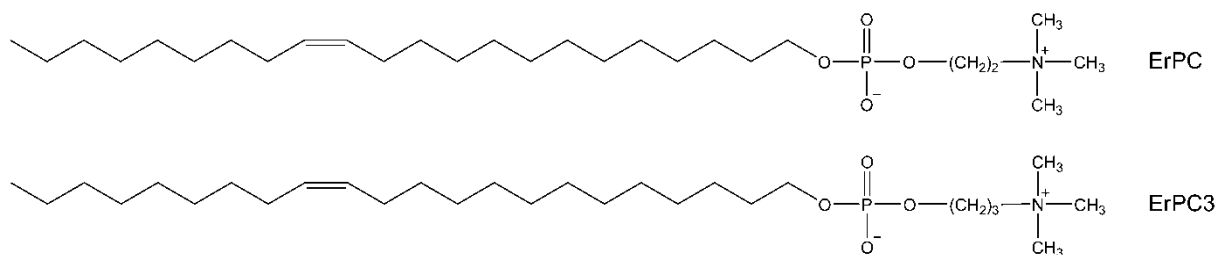
1. АФХ с **типична холинова** полярна глава и **наситена** въглеродородна верига с представители: додецилфосфохолин (DPC), тетрадецилфосфохолин (TPC), хексадецилфосфохолин (HPC, Miltefosine), октадецилфосфохолин (OPC) и ейкозанилфосфохолин (EPC).



2. АФХ с **циклична** полярна глава и **наситена** въглеродородна верига с представители: октадецил-[2-(N-метилпиперидинио)етил]-фосфат (OMPER), октадецил-(N,N-диметил-4-пиперидинио)-фосфат (ODPP, Perifosine), хексадецил-[2-(N-метилпиперидинио)етил]-фосфат (HPPip), хексадецил-[2-(N-метилморфолинио)етил]-фосфат (HPMorph) и др. (Lukas, Mojzis et al. 2009).



3. АФХ с **типична или модифицирана** полярна глава и **ненаситена** въглеродородна верига с представители: еруцилфосфохолин (ErPC), еруцилфосфо-N,N,N-триметилпропиламин (ErPC3, Erufosine) и др.



Синтезирани са и производни с етерни, хидроксилни или карбоксилни групи във въглеродородната верига, които обаче се характеризират с по-ниска активност и по-висока токсичност от Miltefosine (Agresta, D'Arrigo et al. 2003).

2.3. Връзка структура-действие

При първата група АФХ с увеличаване на дължината на алкилния остатък се наблюдава повишаване на противотуморната активност, измерена по отношение на левкемични клетъчни линии (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998). Тази активност е максимална при дължина на въглеродородната верига от 22 въглеродни атома и намалява при по-нататъшно удължаване. Спрямо карцином на млечната жлеза, обаче, най-активният представител е НРС при *in vivo* приложение, а ОРС при *in vitro* приложение (Fichtner, Zeisig et al. 1994). При скъсяване на въглеродородната верига до 12 въглеродни атома, противотуморната активност се изгубва (Kotting, Berger et al. 1992; Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998). Циклизирането на полярната глава (втора група АФХ) води до повишаване на активността спрямо левкемични клетъчни линии (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998; Konstantinov, Eibl et al. 1999) и до понижаването и спрямо клетъчна линия 5637, изолирана от карцином на пикочния мехур (Konstantinov and Berger 1999). Въвеждането на двойна връзка в алкилната верига (тре-

та група АФХ) води до силно понижаване на хемолитичните свойства и възможност за интравенозно приложение (Hilgard, Klenner et al. 1993). Освен това се понижава токсичността и се повишават противотуморната и антипротозойната активност (Sobottka, Berger et al. 1993; Konstantinov, Eibl et al. 1999). Въвеждането на допълнителна метилена група в холиновия остатък повишава водоразтворимостта и намалява нежеланите холиномиметични ефекти (Konstantinov, Eibl et al. 1999).

2.4. Фармакокинетика

Изследвания при плъхове показват, че НРС и ОРС имат почти пълна гастроинтестинална резорбция, а ЕрРС – около 90% (Kotting, Berger et al. 1992). АФХ не са субстрати за много от ензимите, метаболизиращи алкиллизофосфолипидите и се натрупват в по-голяма степен в тъканите (Jendrossek and Handrick 2003). АФХ се отличават с висока степен на свързване с плазмените протеини (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Това обяснява наблюденията, че *in vitro* АФХ са по-ефективни в среда без серум (Konstantinov and Berger 1999).

ЕрРС се метаболизира по-бързо от НРС и ОРС, което обяснява необходимостта от по-високи перорални дози (120 $\mu\text{mol/kg}$ срещу 51 $\mu\text{mol/kg}$ за НРС или ОРС) за постигане на сходна туморна регресия (Kotting, Berger et al. 1992). Интересното в случая е, че трите съединения се отличават по органното си разпределение. НРС се натрупва в бъбреците, белите дробове и черния дроб, като е установена органна токсичност спрямо бъбреците, водеща до бъбречна недостатъчност (Kotting, Berger et al. 1992). Бъбречна недостатъчност е установена и при клинични проучвания върху хора (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). ОРС се натрупва в белите дробове, бъбреците и тънкото черво. ЕрРС се натрупва само в белите дробове. Независимо от тези различия, те осигуряват една и съща концентрация в тумора (в случая карцином на млечната жлеза) (Kotting, Berger et al. 1992). Това показва явно предимство на ЕрРС предвид намалената възможност за странични ефекти от страна на прицелни органи.

Клинично проучване при пациенти с кожна лайшманиоза показва, че след перорално прилагане на Miltefosine в доза $3 \times 50 \text{ mg/ден}$ в продължение на 3-4 седмици се постига плазмена концентрация от 75,6 μM (Dorlo, van Thiel et al. 2008). Около 95% от наличния в плазмата милтефозин е свързан с плазмените протеини. Клирънсът е 3,87 l/d. Времето на полуелиминаране $t_{1/2\alpha}$ (от централния компартимент) е около 7 дни, а $t_{1/2\beta}$ (от перифер-

ния компартимент) е около 31 дни. Поради изключително бавното си елиминиране от организма, Miltefosine може да се открие в плазмата 5-6 месеца след приключване на едномесечен терапевтичен курс. Метаболизира се основно от фофолипаза D, при което се освобождават холин, холин-съдържащи метаболити и хексадеканол. По-малко от 0,2% от приетата доза се екскретира непроменена с урината (Dorlo, van Thiel et al. 2008).

Клинично проучване на Perifosine от I фаза показва, че при натоварваща доза от 900 mg *per os* и поддържаща от 100 mg/ден, постоянна плазмена концентрация се постига още на втория ден ($C_{SS} = 14,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$). Клирънсът е $0,67 \pm 0,05 \text{ l/h}$. Времето на полуелиминиране е 131 ± 26 часа (Van Ummersen, Binger et al. 2004). Данни от проучване при плъхове показват, че за разлика от милтефозина, перифозинът почти не се разгражда от катаболитни ензими. Една седмица след еднократно приложение, само 4% от остатъчното количество Perifosine в плазмата се открива под форма на разпаден продукт (Vink, Schellens et al. 2005). Perifosine се разпределя в цялото тяло на плъховете, като се натрупва най-вече в тънкото черво. За разлика от милтефозина, перифозинът не се натрупва специфично в бъбреците и поради тази причина не води до бъбречна дисфункция. Най-ниски концентрации са установени в мозъка и сърцето.

Фармакокинетични изследвания при интравенозно приложение на ErPC върху плъхове показват различно органно разпределение в сравнение с пероралното приложение – натрупване в белите дробове, тънкото черво, надбъбречните жлези, мозъка и далака, без развитие на органна токсичност (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Натрупването в мозъка е от особен интерес като се има предвид, че повечето от класическите цитостатици не преминават през кръвно-мозъчната бариера. Постоянна плазмена концентрация е достигната едва след 4 седмици (при прилагане на 40 mg/kg ErPC през 48 h). Максималната плазмена концентрация C_{max} е $1,6 \pm 0,3 \text{ mM}$. Фармакокинетичните параметри показват двукомпартиментно разпределение. Времето на полуелиминиране $t_{1/2\alpha}$ (от централния компартимент) е $0,18 \pm 0,09 \text{ h}$, а $t_{1/2\beta}$ (от периферния компартимент) е $3,3 \pm 0,88 \text{ h}$. Клирънсът е $9,7 \pm 1,2 \text{ ml/h}$. ErPC не се открива в урината (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999).

При хронично интраперитонеално или подкожно приложение на Erufosine при „голи“ мишки е наблюдавано органно разпределение, сходно с това на ErPC при плъхове. Най-големи концентрации на ErPC3 са отчетени в далака, бъбреците и белите дробове, но не е наблюдавана органна токсичност (Henke, Lindner et al. 2009). Подобно на ErPC, ErPC3 също се натрупва в мозъка, където постига по-висока концентрация от опреде-

лената като цитотоксична спрямо клетъчни линии от малигнен глиом. Плазмената концентрация на третата седмица от началото на третирането е $68 \pm 23 \mu\text{M}$ при прилагане на 20 mg/kg Erufosine i.p. през 48 h или $109 \pm 33 \mu\text{M}$ при прилагане на 40 mg/kg Erufosine i.p. през 48 h. Максималната измерена плазмена концентрация във втория случай е $217 \pm 25 \mu\text{M}$. Времето на полуелиминиране $t_{1/2\alpha}$ (от централния компартимент) е $5,86 \pm 0,5 \text{ h}$, а $t_{1/2\beta}$ (от периферния компартимент) е $37,68 \pm 3,88 \text{ h}$. ErPC3 преминава в незначителна степен в урината (Henke, Lindner et al. 2009).

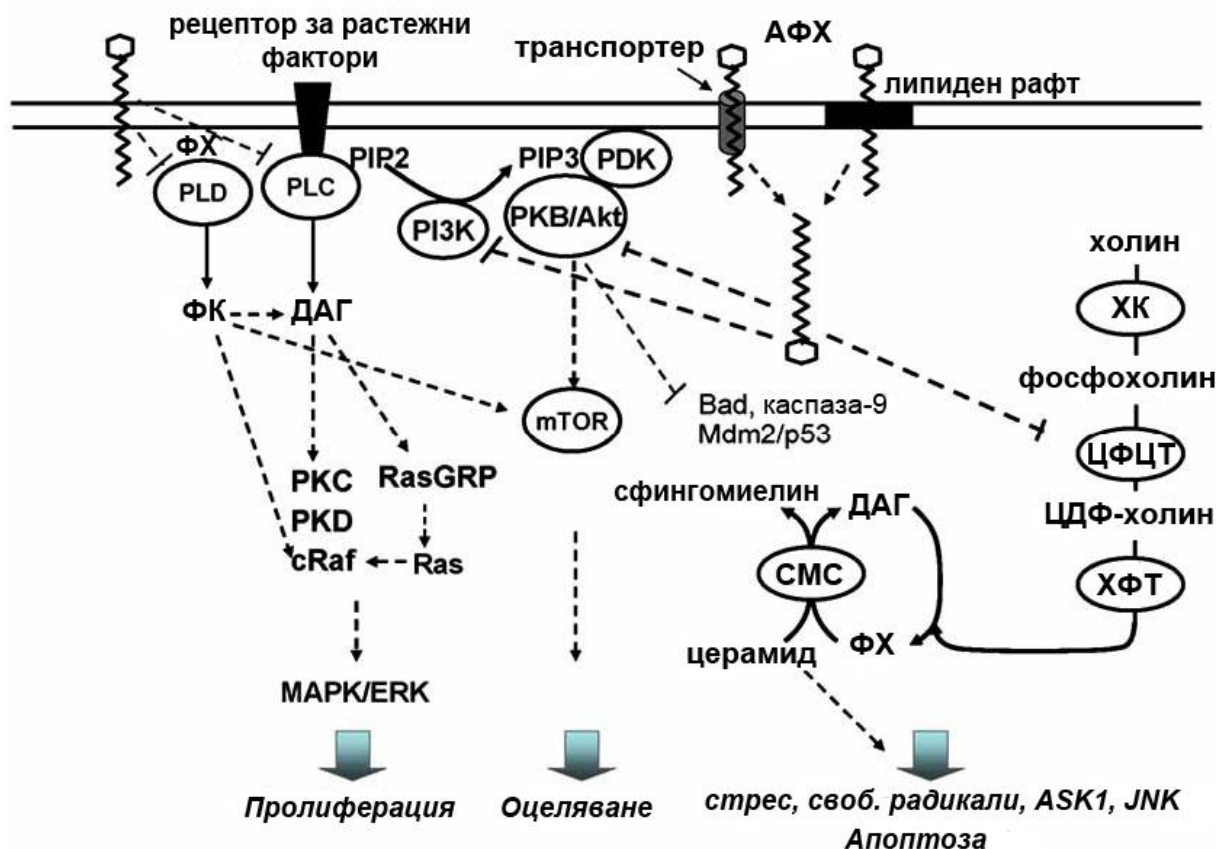
2.5. Механизъм на действие

Механизмът на противотуморно действие на АФХ се различава от този на класическите цитостатици. АФХ лесно се вмъкват в липидния бислой на плазмената мембрана. Тъй като са повърхностно активни вещества, във високи концентрации те могат да предизвикат лизиране на клетките. При по-ниски концентрации метаболитно стабилните АФХ се намесват в обмяната на фосфолипидите и сигнално-трансдукционните пътища. Нормалният биосинтез и обмен на фосфолипидите определя не само поддържането на целостта на мембраните, но и адекватната наличност от прекурсори за синтез на липидни вторични посредници, като диацилглицерол (ДАГ), фосфатидна киселина (ФК) и фосфоинозитиди. Вмешателството в липидните метаболитни пътища причинява стрес в клетката, който може да задейства програмирана клетъчна смърт (van Blitterswijk and Verheij 2008). По нататък са разгледани различни аспекти от взаимодействието на АФХ с клетъчните структури. При различните видове клетки преобладава значението на едни или други от изброените механизми.

2.5.1. Инхибиране на биосинтеза на фосфатидилхолин

Фосфатидилхолинът (ФХ) съставлява повече от 50% от общото количество фосфолипиди в мембраните на еукариотните клетки. Инхибирането на биосинтеза на този есенциален фосфолипид предизвиква силен стрес в клетките (van Blitterswijk and Verheij 2008). Попадайки в мембраните на ендоплазмения ретикулум (ЕПР), АФХ потискат скоростопределящия етап в *de novo* синтеза на ФХ. Те постигат това чрез инхибиране на ензима ЦТФ:фосфохолин-цитидилтрансфераза (ЦФЦТ). В следствие на това се индуцира апоптоза при експоненциално делящите се клетки, но не и при клетките в

състояние на покой. Лизофосфатидилхолинът (ЛФХ) е алтернативен прекурсор за синтез на ФХ. Екзогенният ЛФХ предотвратява задействането на апоптоза от АФХ, но не и от други стимули, което потвърждава валидността на този механизъм на действие на АФХ (Jendrossek and Handrick 2003).



Фиг. 1.4. Обобщение на различните механизми на действие на АФХ (van Blitterswijk and Verheij 2008). Означения: АФХ – алкилфосфохолин, ДАГ – диацилглицерол, СМС – сфингомиелинсинтаза, ФК – фосфатидна киселина, ФХ – фосфатидилхолин, ХК - холинкиназа, ХФТ – холин-фосфотрансфераза, ЦДФ – цитидиндифосфат, ЦФЦТ - ЦТФ:фосфохолин-цитидилтрансфераза, MAPK - митоген-активирани протеин-кинази, PDK – фосфоинозитид-зависима киназа, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа, PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, PIP₃ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат, PKB (PKC, PKD) – протеин-киназа В (С, D), PLC (PLD) – фосфолипаза С (D).

Синтезът на фосфатидилхолин е изключително важен за пролиферацията на клетките и е засилен при туморните клетки. ФХ не само е съществен за образуването на нови клетъчни мембрани, но е и прекурсор за синтеза на вторичните посредници ДАГ и ФК, както и на сфингомиелина (van Blitterswijk and Verheij 2008). Не е ясно как точно потискането на образуването на ФХ индуцира апоптоза, но има някои предположения.

Една възможност е, че чрез потискане на образуването на сфингомиелин се натрупва неговия прекурсор церамид. Смята се, че церамидът може да предизвиква сливане на мембранните липидни рафтове и да играе роля на вторичен посредник при индуциране на апоптоза (Jendrossek and Handrick 2003). Друга възможност е предизвикването на ЕПР- и оксидативен стрес. Установено е, че в някои случаи изчерпването на ФХ активира проапоптотичния транскрипционен фактор CHOP/GADD153, който е свързан с ЕПР-стреса. Този фактор може да повиши нивата на проапоптотичните протеини Bax, Bak и Bim (van Blitterswijk and Verheij 2008).

2.5.2. Повлияване на сигналния път Ras/Raf/MEK/ERK

Фосфолипаза D (PLD) катализира хидролизата на ФХ до ФК и холин. ФК може да бъде деацилирана до лизофосфатидна киселина (ЛФК) под действието на фосфолипаза A₂ или пък да бъде дефосфорилирана до ДАГ. Както ЛФК, така и ДАГ са митогени. При еднократно приложение АФХ стимулират фосфолипаза D, но хроничното третиране води до силно инхибиране на ензима (Lucas, Hernandez-Alcoceba et al. 2001). Това може до известна степен да обясни първоначалното стимулиране и последващо потискане на пролиферацията на левкемични клетки при третирането им със субцитотоксични концентрации на АФХ (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998). ФК активира протеин-киназа C-ζ (PKC-ζ), c-Raf и mTOR. ДАГ активира протеин-кинази C и D (PKC и PKD), както и RasGRP. Така ФК и ДАГ активират сигналния път Ras/Raf/MEK/ERK (van Blitterswijk and Verheij 2008). Последната киназа във веригата (ERK) фосфорилира множество транскрипционни фактори (c-Jun, c-Myc и др.) и други кинази (напр. p90RSK, която от своя страна активира транскрипционния фактор CREB) (Vink, van Blitterswijk et al. 2007).

АФХ могат да инхибират и фосфолипаза C (PLC), с което също нарушават образуването на ДАГ и сигналната трансдукция през Ras/Raf/MEK/ERK (Hilgard, Klenner et al. 1993; van Blitterswijk and Verheij 2008). Инхибирането на PLC нарушава образуването на фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP₃) и предизвиква дезорганизация на активните филаменти.

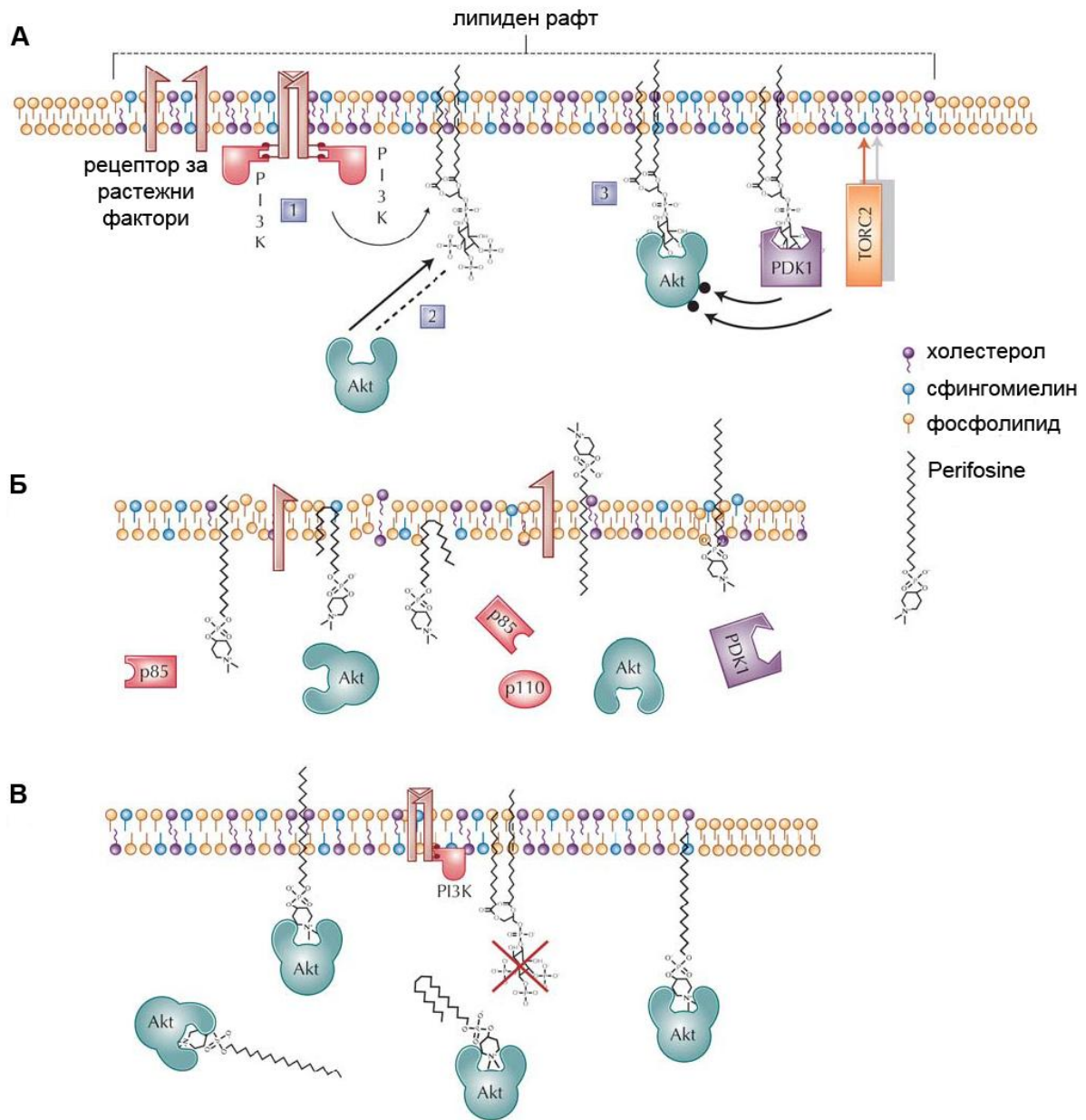
2.5.3. Инхибиране на сигналния път PI3K/Akt

АФХ могат да инхибират сигналния път PI3K/Akt. Те постигат това нарушавайки локализирането на Akt (известен още като протеин-киназа B) в плазмената мембрана. Потиска се активирането на Akt, тъй като се възпрепятства фосфорилирането му при Tyr308 от PDK1 и при Ser473 от комплекса mTOR/Rictor (TORC2) – процеси, които се извършват в мембраната (Gills and Dennis 2009). Експресията на Akt в клетки на миристилизирана форма на Akt, която е конститутивно свързана с мембраната, преодолява инхибиращия ефект на Perifosine (Kondapaka, Singh et al. 2003). Засега няма ясен отговор на въпроса как точно АФХ пречат на локализирането на Akt в мембраната. Според някои автори това се случва поради намалената продукция на PIP₃, който нормално се свързва с плекстрин-хомоложния домен на Akt. Други данни показват, че АФХ не инхибират фосфатидилинозитол-3-киназата (PI3K, ензимът превръща фосфатидилинозитола в PIP₃), което оставя възможността АФХ пряко да инхибират свързването на PIP₃ с плекстрин-хомоложния домен на Akt (фиг. I.5) (van Blitterswijk and Verheij 2008). В резултат на инхибирането на сигналния път PI3K/Akt се повишава експресията на p21^{WAF1/Cip1}, потиска се циклин-зависимата киназа 2 (CDK2), активира се Rb и клетъчният цикъл спира. Повлияват се и други регулирани чрез Akt протеини. Така например Akt фосфорилира и инактивира Bad, каспаза-9, както и транскрипционните фактори Forkhead и CREB; потиска функциите на p53; фосфорилира и активира mTOR и ИКК. Интересно е, че перифозинът може да индуцира разграждане на mTOR по алтернативен механизъм, чрез протеазомата (Fu, Kim et al. 2009). Това допълнително води до инхибиране на фосфорилирането на Akt.

2.5.4. Активиране на JNK

Киназата JNK е ключов участник в сигналния път, който по принцип се активира от различни стресови фактори (възпалителни цитокини, Fas/CD95, ултравиолетова и йонизираща радиация, топлинен шок, реактивни кислородни радикали) и може да индуцира апоптоза. JNK се активира посредством киназите MKK4 и MKK7, а те – посредством киназите MEKK1 и ASK1. АФХ могат да въздействат върху MEKK1 и ASK1 по различни механизми и така активират JNK (van Blitterswijk and Verheij 2008). Освен това е известно, че Akt може да фосфорилира и инактивира ASK1, което показва и възможността JNK да бъде активиран чрез инхибиране на Akt. JNK повишава експресията на c-Jun

и фосфорилира антиапоптотичния протеин Bcl-X_L, с което може да индуцира апоптоза (Jendrossek and Handrick 2003; van Blitterswijk and Verheij 2008).



Фиг. I.5. Нормален процес на активиране на Akt и вероятни механизми, по които АФХ го инхибират (Gills and Dennis 2009). А – нормално активиране на Akt в липидните рафтове, протичащо в три етапа; Б – АФХ нарушават структурата и сигналната трансдукция в липидните рафтове; В – АФХ пряко инхибират свързването на PIP₃ с плекстрин-хомоложния домен на Akt. Означения: PDK – фосфоинозитид-зависима киназа, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа.

2.5.5. Лиганд-независимо активиране на Fas/CD95

Известно е, че алкилфосфохолините въздействат върху плазмената мембрана като променят флуидитета и структурата ѝ (Arndt, Zeisig et al. 1997). Има данни, че при левкемични клетъчни линии, АФХ се натрупват главно в т. нар. липидни рафтове („сало-ве“) – микроучастъци от плазмената мембрана, които са богати на холестерол и сфинголипиди и са устойчиви на действието на детергенти (van Blitterswijk and Verheij 2008). Липидните рафтове могат да служат като платформи за осъществяване на сигналната трансдукция, като включват или отделят протеини в отговор на вътре- или извънклетъчни стимули. АФХ повишават нивото на холестерола и понижават нивото на сфингомиелина в липидните рафтове (Jimenez-Lopez, Rios-Marco et al. 2010). АФХ могат да предизвикат сливане на липидните рафтове и обогатяването им с различни сигнални протеини. Например перифозинът предизвиква натрупване в липидните рафтове на „рецептори на смъртта“ (Fas/CD95, TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5) и протеини, опосредстващи предаването на апоптотичните сигнали (FADD, прокаспаза-8, прокаспаза-10, Bid и JNK) (Nieto-Miguel, Gajate et al. 2006; Gajate and Mollinedo 2007). При миеломни клетки MM144 това улеснява взаимодействието между Fas/CD95, FADD и прокаспаза-8 или -10 и формирането на активния комплекс DISC, задействащ външния път на апоптозата, дори без наличие на лиганда FasL/CD95L. Bid, от друга страна, осъществява връзка с вътрешния апоптотичен път. Тези промени индуцират апоптоза много по-бързо, отколкото това става чрез инхибиране на синтеза на ФХ.

2.5.6. Инхибиране на Ca²⁺-зависимата АТФ-аза

Някои АФХ (например тези с циклична полярна глава) понижават активността на мембранната Ca²⁺-АТФ-аза в левкоцитните мембрани (Grosman 2001). Така се стига до повишаване на вътреклетъчната концентрация на Ca²⁺, с което би могло да се обясни стимулирането на неутрофилен отговор при клинични изпитвания върху пациенти. Смята се, че инхибирането на мембранната Ca²⁺-АТФ-аза не е пряко, а до него се стига поради промяна в липидното обкръжение на ензима.

2.5.7. Непреки механизми

Освен изброените дотук ефекти, които могат да се категоризират като преки, съществуват и други – непреки. Такива са ефектите опосредствани чрез имунната система – активиране на Т-лимфоцитите и макрофагите, повишаване на експресията на рецепторите за IL-2, стимулиране на продукцията на интерферон гама, TNF- α , IL-3 и GM-CSF (Hilgard, Klenner et al. 1993; Mollinedo 2007). С различната степен на изява на преките и непреки механизми на действие при отделните представители би могъл да се обясни фактът, че *in vitro* OPC е по-активен срещу карцином на млечната жлеза, докато *in vivo* NPC е с по-голяма активност (Fichtner, Zeisig et al. 1994).

2.6. Предклинични данни за фармакологичните ефекти

АФХ проявяват значителна цитотоксична активност спрямо голям брой левкемични и лимфомни клетъчни линии: HL-60, THP1 и NB4 (остра миелогенна левкемия, ОМЛ); Reh и СЕМ (остра лимфоцитна левкемия, ОЛЛ); Jurkat, SKW-3 и MOLT-4 (Т-клетъчна левкемия); MM.1S, MM1.R, M144, U-266, OPM-2, RPMI-8226 и INA-6 (мултиплен миелом); BCWM.1, WSU-WM, MEC-1 (макроглобулинемия на Waldenström); Raji и Ramos (лимфом на Бъркит) (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998; Hideshima, Catley et al. 2006; Leleu, Jia et al. 2007; Fiegl, Lindner et al. 2008; Martelli, Papa et al. 2010). Доказано е индуциране на апоптоза при голяма част от тях. IC₅₀ на Perifosine спрямо изброените миеломни клетъчни линии е между 1 и 15 μ M при 48-часово време за въздействие. Перифозинът действа и срещу миеломни клетки, изолирани от пациенти с резистентност към конвенционални цитостатици, включително и когато са адхерирали към СКМК (Kastritis, Charidimou et al. 2009). Perifosine е много ефективен при миши *in vivo* модели на ММ и макроглобулинемия на Waldenström, базирани на подкожно инжектиране на туморни клетки с човешки произход (Hideshima, Catley et al. 2006; Leleu, Jia et al. 2007). Еруфозинът е ефективен срещу туморни клетки, изолирани от пациенти с хронична лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) (Konigs, Pallasch et al. 2010). АФХ проявяват цитотоксична активност и срещу туморни клетки, произхождащи от пациенти с хронична миелогенна левкемия (ХМЛ), като в този случай тяхната ефективност зависи от нивото на фузионния онкопротеин BCR-ABL (Konstantinov, Eibl et al. 1999). Този фузионен протеин активира сигналните пътища Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT и PI3K/Akt и така постига пролиферативен и антиапоптотичен ефект (Konstantinov, Georgieva et al. 2002).

АФХ имат значителна противотуморна активност срещу естроген-рецептор-отрицателни карциноми на млечната жлеза, както *in vitro*, така и *in vivo* (Kotting, Berger et al. 1992; Fichtner, Zeisig et al. 1994; Vink, van Blitterswijk et al. 2007). АФХ упражняват цитотоксично действие спрямо клетъчните линии EJ и 5637, произхождащи от карцином на пикочния мехур (Konstantinov and Berger 1999), и биха могли да бъдат използвани чрез инстилация на техни разтвори в пикочния мехур. ЕгРС понижава пролиферацията и жизнеспособността на клетки С6, Т98G, U87MG и А172, произхождащи от астроцитом/глиобластом при плъх (С6) или човек (останалите) (Jendrossek, Hammersen et al. 2002). АФХ са ефективни още срещу клетъчните линии РС-3 (карцином на простатата); HeLa (карцином на шийката на матката); H460, H358, H157 и H226 (белодробен карцином) (Jendrossek and Handrick 2003; Fu, Kim et al. 2009).

Милтефозинът инхибира насочената миграция и инвазивността на клетки МО-4 *in vitro* (Hilgard, Klenner et al. 1993). Подобен ефект се наблюдава и спрямо хемотаксиса на гранулоцитите. Перифозинът потиска миграцията и адхезивната способност на миеломни клетки MM.1S (Huston, Leleu et al. 2008).

Много интересен е фактът, че за разлика от класическите цитостатици, алкилфосфохолините не са миелотоксични и дори стимулират костно-мозъчната хемопоеза. Този ефект е особено силно проявен при представителите с по-къса алкилна верига (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998) и може да се използва за понижаване на костно-мозъчната токсичност на стандартните антинеопластични лекарства (Georgieva, Konstantinov et al. 2002). Стимулиране на пролиферацията се наблюдава и при някои левкемични клетъчни линии (К-562, HL-60), при концентрации по-ниски от цитотоксичните (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998). След системно приложение на АФХ се наблюдава левкоцитоза и тромбоцитоза (Jendrossek and Handrick 2003).

Алкилфосфохолините имат способността да индуцират диференциация. Тази тяхна способност е наблюдавана по отношение на различни видове туморни и нормални клетки. В хода на терапията типичната структура на аденокарцином на млечната жлеза постепенно придобива хистологични признаци на нормална тъкан на млечна жлеза, секретиреща мляко (Hilgard, Klenner et al. 1993). При третиране на клетки LAMA-84 е установено, че АФХ стимулират проявяването на фибробластен фенотип и адхерентен растеж (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998). Този ефект е особено силно проявен при ЕгРС и ЕгРС3 и може да допринесе за по-дългото задържане на ХМЛ-бластите в костния мозък и тяхното съзряване. При третиране на промиелоцитната левкемична клетъчна линия U-937 с милтефозин е наблюдавана индукция на хистон H1, която се

счита за предшественик на моноцитната диференциация (Hilgard, Klenner et al. 1993). Друг аспект на диференциацията, предизвиквана от алкилфосфохолините е левкоцитозата, регистрирана след системното им приложение, която се характеризира с преобладаването на зрели гранулоцити.

АФХ проявяват антипротозойна активност. Особено ефективни са срещу видове *Leishmania* и *Trypanosoma cruzi*, но действат също и срещу *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica* и *Acanthamoeba spp.* (Mollinedo 2007).

Установено е, че *in vitro* АФХ потискат пролиферацията на клетките от пигментния епител на ретината (вероятно чрез инхибиране на РКС) и медираното от тях контрахиране на колагеновия матрикс – процеси, участващи в патогенезата на пролиферативната витреоретинопатия (Eibl, Vanas et al. 2003). Освен това потискат адхезивната и миграционна способности на тези клетки (Eibl, Kook et al. 2006). При зайци АФХ потискат пролиферацията на глиалните Мюлерови клетки в ретината, настъпващо след отлепянето ѝ (Eibl, Lewis et al. 2007). АФХ биха могли да намерят приложение при лечение на пролиферативната витреоретинопатия.

Miltefosine потиска пролиферацията на нормални човешки кератиноцити и вероятно би могъл да намери приложение при хиперпластични заболявания на епидермиса, напр. псориазис (Mollinedo 2007).

Алкилфосфохолините предизвикват холиномиметични ефекти по отношение на стомашно-чревния тракт (Konstantinov, Eibl et al. 1999).

Милтефозинът повишава пропускливостта на т. нар. “tight-junctions” – участъците на свързка между епидермалните клетки на лигавицата (Ward, Ouyang et al. 2003). Това се обяснява с инхибирането на PLC- β и последващата дезорганизация на актиновите филаменти.

2.7. Данни от клинични проучвания

Засега Miltefosine е единственият представител на АФХ, който е регистриран като лекарствен продукт. Под форма на 6% разтвор (MilteX®) е показан за палиативна локална терапия на кожни метастази на карцином на млечната жлеза. Постига терапевтичен отговор при около 43% от пациентите (Mollinedo 2007). Ефективен е и при кожни лимфоми (Vink, van Blitterswijk et al. 2007). Пероралната форма (Impavidio®) се прилага за лечение на висцерална лайшманиоза с много висока ефективност – излекуване на 94%

от пациентите (Mollinedo 2007). При кожна лайшманиоза постига излекуване на 33-91% от пациентите в зависимост от конкретния причинител. Проучвана е възможността да се използва при различни солидни тумори, но не е демонстрирана клинична ефективност при поносими дози.

Проведено е клинично проучване от II фаза на Perifosine (150 mg/ден) в комбинация с Dexamethasone (20 mg два пъти седмично) при пациенти с рецидивирал или рефрактерен ММ (Mitsiades, Hideshima et al. 2009). Постигнат е терапевтичен отговор при 35% от пациентите. При друго подобно проучване от I фаза е изследвано комбинирано приложение на перифозин с леналидомид и дексаметазон. Постигнат е терапевтичен отговор при 70% от пациентите. В момента се провежда клинично проучване от II фаза на комбинацията Perifosine/Bortezomib при пациенти с рецидивирал и рефрактерен ММ, 69% от които с резистентност към бортезомиб. Бортезомибът се прилага по стандартната схема, а перифозинът по 50 или 100 mg/ден. Предварителни данни показват постигане на пълна ремисия в 4% от случаите, като общата честота на постигане на терапевтичен отговор е 38%. При подгрупата от пациенти с развита резистентност към бортезомиб терапевтичен отговор е постигнат в 15% от случаите. Средният период без прогресия на заболяването е 6,3 месеца в общата популация и 6,2 месеца в подгрупата с резистентност към Bortezomib (Mitsiades, Hideshima et al. 2009). Обещаващи резултати са получени и при проучвания от II фаза на перифозин върху пациенти с макроглобулинемия на Waldenström, някои типове саркоми и хепатоцелуларни карциноми (Gills and Dennis 2009). Не са получени задоволителни резултати при карцином на панкреаса, простатата или млечната жлеза, както и при малигнен меланом.

2.8. Фармакологичен профил на безопасност

Основните и дозолIMITИРАЩИ НЛР на Miltefosine при перорално приложение се дължат на холиномиметичните му ефекти и са от страна на стомашно-чревния тракт – гадене, повръщане и диария (Mollinedo 2007). Тези НЛР се повлияват добре от Domperidone. Наблюдавано е и развитие на бъбречна недостатъчност (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Стомашно-чревни прояви и нефротоксичност са установени и при плъхове. Наблюдавана е и анемия поради хемолиза (Fichtner, Zeisig et al. 1994). При интравенозно приложение на Miltefosine при плъхове се развива тежка хемолиза, съчетана с некроза и тромбофлебит в мястото на инжектиране (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999). Уста-

новени са и тератогенни ефекти (Mollinedo 2007). Интензитетът на хемолитичните и стомашно-чревните прояви може да бъде значително намален чрез включване на АФХ в липозоми, като при това не се наблюдава намаляване на терапевтичния потенциал (Fichtner, Zeisig et al. 1994; Arndt, Zeisig et al. 1997). Нежеланите лекарствени реакции при локалното приложение на Miltefosine се изразяват в зачервяване, сърбеж и парене (Hilgard, Klenner et al. 1993).

Perifosine има сходни НЛР. Стомашно-чревните прояви са малко по-слабо изразени отколкото при милтефозина, но все пак са дозолимитиращи (Mollinedo 2007). Често се наблюдава умора (Gills and Dennis 2009).

АФХ с двойна връзка в алкилната верига (ErPC и ErPC3) се отличават с липса на хемолитични свойства и могат да се прилагат интравенозно. При плъхове не са установени сериозни нежелани ефекти. При високи дози ErPC се наблюдава загуба на апетит и намаляване на телесното тегло (Erdlenbruch, Jendrossek et al. 1999).

За разлика от класическите цитостатици АФХ се отличават с липса на миелотоксичност и дори имат стимулиращи ефекти по отношение на костно-мозъчната хемопоеза при мишки (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998; Catley, Hideshima et al. 2007).

АФХ имат много по-слаб кластогенен ефект в сравнение с класическите цитостатици (Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998).

2.9. Рационални комбинации с други лекарства

Различните механизъм на действие и токсикологичен профил на АФХ (спрямо класическите цитостатици) обуславят възможността за приложение на рационални комбинации, отличаващи се с повишен ефект и намалена костно-мозъчна токсичност. Така например, перифозинът повишава антимиеломната активност *in vitro* на Bortezomib, Dexamethasone, Melphalan, Lenalidomide и 17-DMAG (Hideshima, Catley et al. 2006; Huston, Leleu et al. 2008). Перифозинът постига синергизъм още с: Cisplatin, Doxorubicin и Cyclophosphamide при плъши модел на карцином на млечната жлеза (Mollinedo 2007); Temozolomide при малигнени глиоми *in vitro* и *in vivo* при мишки (van Blitterswijk and Verheij 2008); Etoposide и ХДАИ срещу различни левкемични клетки (Vink, van Blitterswijk et al. 2007). При последователно прилагане на Gemcitabine и Erufofosine върху клетъчни линии от ХМЛ се наблюдава синергистично потенциране на ефектите, когато Gemcitabine е приложен пръв, или антагонизъм при първоначално трети-

ране с Erufosine (Georgieva, Konstantinov et al. 2002). Комбинирана терапия с циклофосфамид и милтефозин постига по-добър ефект при плъхове със сарком, а и броят на левкоцитите се възстановява по-бързо до референтната стойност, в сравнение с монотерапия с циклофосфамид (Stekar, Hilgard et al. 1995). Прилагането на милтефозин може да редуцира органотоксичните увреждания, предизвикани от циклофосфамид или епирубицин (Martinova, Topashka-Ancheva et al. 2006).

2.10. Обобщение и бъдещи насоки

АФХ са перспективен клас съединения с противотуморна активност, които заслужават по-нататъшно проучване. Засега при ММ са провеждани изследвания само с Perifosine, като са получени обещаващи резултати *in vitro* и *in vivo*. Erufosine обаче се характеризира с някои предимства като по-ниска стомашно-чревна токсичност и липса на хемолитични свойства, позволяващи интравенозно приложение и постигане на по-високи плазмени концентрации. При пациенти с ХЛЛ е постигната концентрация от 60 μM без значителна токсичност (Fiegl, Lindner et al. 2008). Ето защо смятаме за особено перспективно провеждането на детайлно проучване на Erufosine при ММ, първоначално в *in vitro* модели, а при добри резултати и *in vivo*.

3. Куркумин

3.1. Добиване и физикохимични свойства

Куркумата (*Curcuma longa L.*, сем. *Zingiberaceae*), освен като подправка, се използва и като лечебно растение в индийската народна медицина вече повече от 5 000 години (Aggarwal and Shishodia 2004). В спектъра на заболяванията, при които намира приложение, влизат жлъчни и чернодробни заболявания, безапетитие, синусит, ревматизъм, навяхвания и рани. През 1815 г. от коренището на растението е изолирано веществото куркумин, идентифицирано по-късно като диферулоилметан и причислено към групата на полифенолните съединения. В дрогата *Rhizoma Curcumae* са установени и други близкородствени на куркумина съединения. Това са дезметоксикуркумин (куркумин II), бисдезметоксикуркумин (куркумин III) и циклокуркумин (Goel, Kunnumakara et al. 2008). Тези вещества и куркуминът се наричат общо куркуминоиди и съставляват 3-5% от сухото тегло на коренището. Добиват се чрез алкохолна екстракция. В търговски предлагания куркумин се съдържат главно куркумин I (~77%), куркумин II (~17%) и куркумин III (~3%).



Чистият куркумин представлява жълто-оранжев прах, лошо разтворим във вода и етер и добре разтворим в етанол, диметилсулфоксид и ацетон (Goel, Kunnumakara et al. 2008). Алкохолният разтвор има ярко жълт цвят при рН между 2,5 и 7 и червен цвят при рН > 7. В разтвор претърпява кето-енолна тавтомерия, като равновесието е изтеглено в посока към енолната форма. Куркуминът е стабилен в кисела среда, но в неутрална или алкална среда бързо се разгражда до ферулова киселина и ферулоилметан. Във фосфатен буфер с рН 7,2 само за 30 минути куркуминът се разгражда почти напълно. Антиоксидантите обаче забавят този процес. В среда за клетъчно култивиране, съдържаща 10% фетален телешки серум, 50% от разтвореното количество куркумин се разгражда за около 8 часа.

3.2. Фармакокинетика

Куркуминът достига много ниска бионаличност след перорално приложение (Aggarwal, Kumar et al. 2003). Пикът в плазмената концентрация се наблюдава между 1 и 2 часа след приема. След еднократна доза от 2 g куркумин в плазмата се откриват само следи, а след прием на 8 g куркумин плазмената концентрация достига до около 1,77 μM . Главната причина за ниската бионаличност на куркумина е бързият му интестинален и чернодробен метаболизъм. Съвместното перорално приложение на 2 g куркумин с 20 mg пиперин (основният алкалоид в черния пипер и силен инхибитор на лекарствения метаболизъм) осигурява 20 пъти по-висока бионаличност на куркумина, без при това да се наблюдават токсични ефекти. Основните метаболити на куркумина са тетраhydroкуркумин, хексахydroкуркумин и хексахydroкуркуминол, както и техни и на изходното вещество глюкуронидни и сулфатни конюгати. Тетрахydroкуркуминът и хексахydroкуркуминът имат значително по-ниска биологична активност от куркумина, а хексахydroкуркуминолът е лишен от такава. Преобладаващият път на излъчване на куркумина и метаболитите му от организма е чрез жлъчката.

Друг подход за повишаване на бионаличността на куркумина е чрез прилагането му под форма на комплекс с фосфатидилхолин (Meriva®). Доза от 450 mg свързан куркумин осигурява сходна бионаличност с тази след приложение на 4 g свободен куркумин (Jurenka 2009). Проучват се и възможностите за приложение на куркумин включен в липозоми или наночастици (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008).

Проучване при плъхове показва, че в някои органи куркуминът постига по-високи концентрации отколкото в плазмата (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008). Най-висока концентрация е измерена в червата, следвани от черния дроб, далака и бъбреците. При хора също е установено натрупване на куркумин в червата, но измерената концентрация в черния дроб е била много ниска.

3.3. Механизъм на действие

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.

3.3.1. Пряко взаимодействие с различни мишени

Куркуминът инхибира киназния комплекс ИКК и така пречи на активирането на NF- κ B (Aggarwal, Ichikawa et al. 2006). Куркуминът пряко инхибира каталитичната активност на 20S-компонента на протеазомата (Ravindran, Prasad et al. 2009). Сред другите му мишени влизат: P-gp, MRP1, MRP2, глутатион, протеинкинази A и C, протаминкиназа, Erb-B2/HER2, тиоредоксинредуктаза, ксантинооксидаза, липоксигеназа, албумин, α 1-кисел гликопротеин и метални йони като Fe^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} (Goel, Kunnumakkara et al. 2008).

3.3.2. Потискане на активността на различни транскрипционни фактори

Инхибирайки ИКК, куркуминът възпрепятства фосфорилирането и последващото протеазомно разграждане на I κ B α . Освен това куркуминът пряко инхибира протеазомата. Така I κ B α се натрупва в цитозола, блокира транслокацията на транскрипционния фактор NF- κ B в ядрото и се потиска транскрипцията на голям брой онкогени (фиг. I.2). Сред тях влизат гените за синтез на PI3K, Akt, ERK, c-Jun, c-Fos, c-Myc, циклини и циклин-зависими кинази, COX-2, IAP-1, IAP-2, XIAP, Bcl-2, Bcl-X_L и сурвивин (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Куркуминът потиска фосфорилирането и ядрената транслокация на различни транскрипционни фактори от семейството STAT, в зависимост от типа на клетките (Ravindran, Prasad et al. 2009). Особено характерно е инхибирането на STAT3 и последващо индуциране на апоптоза при малигнени плазмоцити (Bharti, Donato et al. 2003; Bharti, Shishodia et al. 2004). Инхибирайки киназата JNK, куркуминът възпрепятства активирането на транскрипционния фактор AP-1. Куркуминът потиска активирането и на транскрипционните фактори β -катенин и Egr-1 (Aggarwal, Kumar et al. 2003; Goel, Kunnumakkara et al. 2008).

3.3.3. Промени в протеиновата експресия

Както вече беше казано, чрез действието си върху транскрипционните фактори куркуминът потиска експресията на редица антиапоптотични протеини и такива стимулиращи пролиферацията. Потиска се също експресията на: провъзпалителни цитокини като IL-1 β , IL-6 и TNF- α ; прометастатични протеини като MMP-2 и MMP-9; адхезионни

протеини като ICAM-1, VCAM-1 и E-селектин; андрогенния рецептор AR; iNOS (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Куркуминът може да потиска експресията на някои протеини и на посттранслационно ниво. Такива данни има например за циклин D1, COX-2 и липоксигеназата (Ravindran, Prasad et al. 2009). Инхибирайки сигналния път PI3K/mTOR/ETS2, куркуминът потиска експресията на MDM2 (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Това от своя страна води до активиране на тумор-супресорния протеин p53. Куркуминът освен това повишава нивото на p53. В резултат на тези промени се повишава експресията на p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1} и p27^{Kip1} – инхибитори на циклин-зависимите кинази. Фазата, в която спира клетъчният цикъл, зависи от вида на клетката (Ravindran, Prasad et al. 2009).

3.3.4. Модулиране на активността на редица кинази

Куркуминът потиска тирозинкиназната активност на EGFR (рецептора за епидермален растежен фактор) (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). Куркуминът стимулира раграждането на Erb-B2/HER2 и нарушава тирозинкиназната му активност. Установено е, че куркуминът понижава активността на сигналния път PI3K/Akt при клетки произхождащи от карцином на простатата, малигнен глиом или Т-клетъчна левкемия. Куркуминът, в зависимост от типа на клетките, може да стимулира или потиска предаването на сигнали през ERK, JNK и/или p38 (Goel, Kunnumakkara et al. 2008; Ravindran, Prasad et al. 2009).

3.3.5. Промени в окислително-редукционния баланс

Куркуминът може да действа както като антиоксидант, така и като прооксидант (Ravindran, Prasad et al. 2009). Конкретните ефекти зависят от концентрацията му, вида на клетките и други фактори, напр. наличие на метални йони. Така например ниски концентрации куркумин защитават хепатоцитите от оксидативен стрес като неутрализират свободните радикали и намаляват липидната пероксидация и освобождаването на цитохром с. Високи концентрации предизвикват изчерпване на глутатиона, активиране на каспаза-3 и апоптоза. При много изследвания след приложение на куркумин е наблюдавана свръхпродукция на реактивни кислородни радикали и индукция на апоптоза при туморни, но не и при нормални клетки. Прооксидантните свойства се обясняват с

инхибиране на ензима орнитиндекарбоксилаза и необратимо модифициране на ензима тиоредоксинредуктаза, превръщащо го от антиоксидантен в прооксидантен (Fang, Lu et al. 2005). Тиоредоксинредуктазата е свръхекспресирана при много тумори, вероятно като механизъм за справяне с по-високия оксидативен стрес, на който по принцип са изложени туморните клетки. Куркуминът може да предизвика увреждане и фрагментация на ДНК в безклетъчна система в присъствие на Cu^{2+} и CYP2D6 (Sakano and Kawanishi 2002).

3.3.6. Индуциране на апоптоза

В зависимост от вида на клетките куркуминът може да индуцира апоптоза предимно чрез външния или предимно чрез вътрешния път. При клетки от белодробен карцином е наблюдавано увреждане на ДНК, индуциране на ЕПР-стрес и активиране на вътрешния апоптотичен път. При меланомни клетки е наблюдавано индуциране на апоптоза чрез външния път (Ravindran, Prasad et al. 2009).

Куркуминът понижава експресията на антиапоптотичните протеини и повишава експресията на проапоптотични протеини като Bax, Bak, Puma, Bim и Noxa, а също и на „рецепторите на смъртта“ Fas/CD95, TRAIL-R1/DR4 и TRAIL-R2/DR5. Предизвиква и агрегация на Fas/CD95 без необходимост от лиганда FasL/CD95L. Куркуминът може да предизвиква освобождаване от митохондриите на фактори като цитохром c, Smac и AIF, които задействат вътрешния апоптотичен път (Ravindran, Prasad et al. 2009).

3.3.7. Индуциране на автофагична клетъчна смърт

Установено е, че при някои клетки куркуминът едновременно потиска сигналния път Akt/mTOR/p70S6K и активира сигналния път Ras/Raf/MEK/ERK. При тези условия се индуцира автофагична клетъчна смърт. Това е наблюдавано например при глиомни клетъчни линии (Ravindran, Prasad et al. 2009).

3.3.8. Други механизми

При сравнително високи концентрации ($> 10 \mu\text{M}$) куркуминът индуцира деполимеризация на микротубулите. Куркуминът може да инхибира hTERT (активната субеди-

ница на ензима теломераза). Описано е и инхибиране на ензима глиоксалаза тип I (Glo1), което води до натрупване в клетката на токсични нива метилглиоксал и глутатион (Ravindran, Prasad et al. 2009).

3.4. Предклинични данни за фармакологичните ефекти

Многобройни проучвания при гризачи показват, че куркуминът може да предотвратява възникване на тумори (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008; Hatcher, Planalp et al. 2008). Той неутрализира ефектите на голям брой канцерогени, предизвикващи например карциноми на дебелото черво, дванадесетопръстника, хранопровода, стомаха, черния дроб, млечната жлеза, простатата или левкемии. Куркуминът предотвратява развитието на карцином на дебелото черво при мишки, които спонтанно развиват аденоматозна полипоза поради мутация в гена *APC*. Има данни, че куркуминът потиска пролиферацията на *Helicobacter pilori*, като по този начин също допринася за намаляване на вероятността за възникване на рак на стомаха.

Куркуминът проявява значителна цитотоксична активност спрямо широк спектър от туморни клетъчни линии, произхождащи от: карциноми на пикочния мехур, панкреаса, простатата, шийката на матката, яйчниците, млечните жлези, белите дробове или бъбреците; невробластоми; остеосаркоми; мултиплен миелом, левкемии и др. (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008). Антинеопластичната активност на куркумина срещу целия този спектър от различни тумори е потвърдена и при животински модели. Куркуминът не само инхибира пролиферацията на туморните клетки и индуцира апоптоза, но потиска и ангиогенезата. При мишки с рак на млечната жлеза или меланом е установено, че куркуминът намалява броя на белодробните метастази (Bagchi and Preuss 2005). Куркуминът намалява адхезивността на малигнените плазмócити към СКМК (Bharti, Shishodia et al. 2004).

Причината за избирателния цитотоксичен ефект на куркумина спрямо туморните клетки не е съвсем ясна, но има няколко предположения (Ravindran, Prasad et al. 2009). Първо, установено е, че туморните клетки поемат повече куркумин от нормалните. Второ, нивата на глутатиона в туморните клетки са по-ниски. Трето, повечето туморни клетки имат конститутивна експресия на NF-κB.

Куркуминът понижава нивата на холестерола и триглицеридите при мишки и плъхове, потиска окислението на липопротеините с ниска плътност (LDL) *in vitro* и при зай-

ци, инхибира агрегацията на тромбоцитите при плъхове, потиска пролиферацията *in vitro* на съдови гладко-мускулни клетки от зайци и плъхове (Bagchi and Preuss 2005). Съвкупността от тези ефекти предполага, че куркуминът би могъл да предпазва от развитие на атеросклероза. Според очакванията е доказан значителен протективен ефект срещу образуване на атеросклеротични плаки при зайци, подложени на атерогенна диета (Bengmark, Mesa et al. 2009). Установено е, че куркуминът може да намали негативните биохимични промени в исхемизираната тъкан след експериментално индуциран миокарден инфаркт у котки и плъхове. Куркуминът подобрява метаболитния статус и забавя прогресията на бъбречното увреждане при плъхове със захарен диабет. Наблюдавано е инхибиране на образуването на холестеролови жлъчни камъни при мишки (Bagchi and Preuss 2005).

Куркуминът потиска възпалението при миши модели на улцеративен колит и плъши модели на панкреатит и артрит (Ravindran, Prasad et al. 2009). Куркуминът облекчава състоянието и удължава преживяемостта на мишки с кистична фиброза (Bengmark, Mesa et al. 2009). Доказан е и антиастматичен ефект при морски свинчета. Проучвания при миши модел на мултиплена склероза показват, че куркуминът потиска продукцията на IL-12 от макрофагите, инхибира диференциацията на антиген-специфичните Th1-лимфоцити и намалява тежестта на симптомите. Куркуминът облекчава симптомите на ендотоксинов шок при мишки, третирани с липополизахарид (Bagchi and Preuss 2005).

Куркуминът намалява оксидативното увреждане и отлагането на амилоидни плаки при миши трансгенен модел на болестта на Алцхаймер. Потискайки липидната пероксидация, куркуминът инхибира катарактогенезата и доксорубицин-индуцираната кардиотоксичност. При плъхове е установено, че куркуминът потиска възникването на хронично алохолно увреждане на черния дроб, на белодробна фиброза под действие на циклофосфамид, блеомицин, амиодарон или хербицида паракват, както и на бъбречно увреждане под действие на доксорубицин (Bagchi and Preuss 2005).

Куркуминът специфично стимулира пролиферацията и диференциацията на миоцитните предшественици в напречно-набраздената мускулатура при мишки – ефект, който вероятно се дължи на потискането на NF- κ B. Куркуминът ускорява зарастването на рани при опитни животни, вероятно чрез повишена продукция на TGF- β 1 и стимулиране на миграцията на фибробласти, миофибробласти и макрофаги (Bagchi and Preuss 2005). Установен е инхибиращ ефект на куркумина върху остеокластогенезата (Bharti, Takada et al. 2004).

Куркуминът потиска по няколко различни механизма репликацията на HIV-1 (Bagchi and Preuss 2005).

3.5. Данни от клинични проучвания

Данни от епидемиологични проучвания показват много по-ниска честота на рак на дебелото черво, млечната жлеза, панкреаса и белите дробове в страни като Индия, където консумацията на куркума е честа (Aggarwal, Kumar et al. 2003). Дневната консумация на куркумин от средностатистическия възрастен индиец се оценява на около 80-200 mg (Bengmark, Mesa et al. 2009). При клинично проучване от I фаза куркумин е прилаган перорално в дози до 8 g/ден в продължение на 3 месеца при пациенти с различни преканцерози. В голям брой от случаите е наблюдавано хистологично подобрене на преканцерозните лезии (Goel, Kunnumakkara et al. 2008). При друго проучване 5 пациенти с фамилна аденоматозна полипоза са лекувани в продължение на 6 месеца с куркумин (3×480 mg/ден) и кверцетин (3×20 mg/ден). Броят на полипите бил редуциран с 60,4%, а размерът им средно с 50,9%. Проведено е пилотно клинично проучване на куркумин (2×2 g/ден) при пациенти с моноклонална гамопатия с неизяснена значимост (Golombick, Diamond et al. 2009). Една седмица след началото на терапията е наблюдавано понижение на серумния парапротеин при 50% от пациентите с изходно ниво на парапротеина над 20 g/l. Понижението е достигало до 30% и в повечето случаи се е запазвало стабилно при проследяване в продължителност на три месеца. При пациентите с изходно ниво на парапротеина под 20 g/l не е наблюдавано понижение, но не е имало и повишение през тримесечния период на проследяване.

Куркумин е прилаган локално под форма на етанолен разтвор или унгвент при пациенти с актинична кератоza, базално-клетъчен карцином или външни генитални брадавици. Постигнато е значително облекчаване на симптомите. Регистрирано е намаляване на сърбежа при почти всички пациенти и намаляване на размера на лезиите при 10%. При пациенти с напреднал карцином на дебелото черво или панкреаса е наблюдавано стабилизиране на състоянието под действие на терапия с куркумин. В ход са клинични проучвания на куркумин при пациенти с карцином на дебелото черво, карцином на панкреаса, мултиплен миелом, миелодиспластичен синдром или остеосарком (Goel, Kunnumakkara et al. 2008; Jurenka 2009).

При клинично проучване здрави доброволци приемали по 500 mg куркумин на ден в продължение на една седмица. Нивото на общия холестерол в серума спаднало с почти 12%, нивото на HDL-холестерола се повишило с 29%, а нивото на липидните пероксиди се понижило с 33% (Jurenka 2009). Тези данни предполагат възможна употреба на куркумина за превенция на артериални заболявания. Доказан е дозозависим жлъчегонен ефект след еднократен прием на 20-80 mg куркумин. Най-високата доза води до 72%-но свиване на обема на жлъчния мехур два часа след приема (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008).

Двойно-сляпо проучване при пациенти с ревматоиден артрит показва, че доза от 1200 mg куркумин на ден има сходна ефективност с фенилбутазон в доза от 300 mg/ден (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008). Куркуминът (400 mg/ден) облекчава болката и отока след операция на ингвинална херния, като в този случай също има сходна ефективност с фенилбутазон (100 mg/ден). Доза от 375 mg куркумин три пъти на ден е оказала благоприятен ефект при пациенти с различни възпалителни заболявания на очите. Установена е ефективност на куркумина при пациенти със синдром на дразнимото черво, болест на Crohn, както и при такива с улцеративен колит в остра или хронична фаза. Резултати от клинично проучване от II фаза при пациенти с язва на стомаха показват, че куркумин в доза 5×500 mg/ден реализира много добър терапевтичен ефект – изчезване на язвата при 48% след 4-седмично лечение и при 76% след 12-седмично лечение (Jurenka 2009). Много добър лечебен ефект е документиран при пациенти с псориазис, чиито лезии са третирани локално с куркуминов гел (Bagchi and Preuss 2005).

Резултати от рандомизирано контролирано проучване при бъбречно-трансплантирани пациенти показват, че комбинирана терапия с куркумин (2×480 mg/ден) и кверцетин (2×20 mg/ден) подобрява бъбречната функция и намалява риска от отхвърляне на присадката. При популационно-базирано проучване е установено, че хора в напреднала възраст, които консумират кърри често или сравнително често, показват по-добри резултати на тест за измерване на когнитивната функция от хора, които не консумират или рядко консумират подправката (Goel, Kunnnumakkara et al. 2008).

3.6. Фармакологичен профил на безопасност

Всички клинични проучвания показват, че куркуминът е изключително нетоксичен. Не е наблюдавана дозолIMITИРАЩА токсичност при прием на единична доза от 12 g или

при 3-месечна терапия с 8 g куркумин на ден (Goel, Kunnumakara et al. 2008; Hatcher, Planalp et al. 2008). Проучване за поносимостта на продължителен прием на 12 g куркумин всеки ден е било прекъснато, единствено защото пациентите изпитвали затруднение да поглъщат толкова голямо количество таблетки. Нужна е обаче известна предпазливост, тъй като във високи дози куркуминът има прооксидантни свойства, особено в присъствие на медни йони. При едно изследване плъхове LEC (порода, за която е характерно натрупване на мед в черния дроб и спонтанно възникване на чернодробни тумори) получавали големи дози куркумин (0,5% от теглото на храната). Регистрирано било от 9- до 25-кратно увеличение на ДНК-адъктите в черния дроб спрямо нетретирани с куркумин животни. Продължителността на живота била намалена от 88,7 на 78,1 седмици (Jurenka 2009). Има и данни, че куркуминът може да нарушава конформацията и функционалната активност на p53 (Hatcher, Planalp et al. 2008).

Описани са случаи на алергичен контактен дерматит при локално приложение на куркумин върху кожата (Goel, Kunnumakara et al. 2008).

3.7. Рационални комбинации с лекарства

In vitro изследвания показват, че куркуминът синергистично потенцира действието на много класически цитостатици като мелфалан, цисплатин, бендамустин, антрациклини, винкристин, паклитаксел и др. (Landis-Piwowar, Milacic et al. 2006; Alaikov, Konstantinov et al. 2007). Синергизъм е наблюдаван и в комбинация с Celecoxib при клетки от карцином на дебелото черво, както и в комбинация с TRAIL при клетки от злокачествен глиом или карцином на простатата (Bagchi and Preuss 2005; Landis-Piwowar, Milacic et al. 2006). Освен това куркуминът сенсibiliзира туморните клетки към йонизираща радиация. В същото време куркуминът предпазва нормални костномозъчни клетки от кластогенността на цисплатин, циклофосфамид и γ -лъчение (Aggarwal, Kumar et al. 2003; Alaikov, Konstantinov et al. 2007).

Куркуминът силно повишава цитотоксичната ефективност на Vincristine срещу миеломни клетки U-266, които по принцип са слабо чувствителни към този цитостатик (Hatcher, Planalp et al. 2008). Този ефект вероятно е свързан със способността на куркумина да инхибира ефлуксната помпа P-гр. Куркуминът възвръща чувствителността към Melphalan на резистентната миеломна клетъчна линия MOLP-2/R (Xiao, Xiao et al. 2010). Това той постига не само чрез инхибиране на ефлукса на мелфалан, но и чрез

инхибиране на сигналния път FA/BRCA, участващ в процеса на репарация на ДНК. Като синергистични са определени и комбинационните цитотоксични ефекти на куркумина с Thalidomide или Bortezomib срещу миеломни клетки U-266 (Park, Аyyappa et al. 2008; Sung, Kunnumakkara et al. 2009). Синергизмът между куркумина и бортезомиба е потвърден и в *in vivo* модел на ММ, базиран на „голи“ мишки с подкожно имплантирани клетки U-266 (Sung, Kunnumakkara et al. 2009).

Куркуминът повишава ефективността на Oxaliplatin при „голи“ мишки с рак на дебелото черво, както и на Gemcitabine при мишки с карцином на простатата. Комбинация от куркумин и Paclitaxel инхибира метастазирването на рак на млечната жлеза към белите дробове на мишки в по-голяма степен, отколкото което и да е от двете вещества, приложено самостоятелно (Goel, Kunnumakkara et al. 2008; Hatcher, Planalp et al. 2008).

Има обаче данни и за антагонистични комбинационни ефекти на куркумина с камптотецинови аналози. Освен това куркуминът потиска ефекта на Cyclophosphamide при „голи“ мишки с рак на млечната жлеза (Hatcher, Planalp et al. 2008).

3.8. Обобщение и бъдещи насоки

Засега куркуминът е със статут на хранителна добавка. Многобройни изследвания обаче показват, че той има значителна противотуморна и в частност противомиеломна активност и откриват перспектива за бъдещото му приложение като лекарствен продукт. Големи негови предимства са изключително ниската му токсичност за нормалните клетки и участието в синергистични лекарствени взаимодействия с цитостатици от различни групи. Смятаме, че 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 костномозъчната среда.

4. Диарсенов триоксид

4.1. История

Диарсеновият триоксид (арсеник, As_2O_3 , АТО) е вещество, което е било известно още на древните гърци и китайци преди повече от 2 000 години (Piazza, Gurrieri et al. 2007). През 1786 г. английският лекар Thomas Fowler предлага употребата на разтвор на калиев арсенит за лечение на треска. През следващите години разтворът на Fowler започнал да се употребява при голям брой заболявания: ревматизъм, паралитични състояния, епилепсия, меланхолия, рахит, палпитации, сифилис, диспепсия и др. As_2O_3 е използван в онкологичната практика още през XIX век, когато е бил основното средство за лечение на ХМЛ, но през 30-те години на XX век отстъпва пред лъчетерапията и бусулфана (Verstovsek, Giles et al. 2006). През 70-те години на XX век в Китай са получени първите данни за ефективност на As_2O_3 при пациенти с остра промиелоцитна левкемия (ОПЛ). По това време става ясно също, че арсеновите съединения са канцерогенни и причиняват рак на кожата и на белите дробове. През 90-те години са проведени множество клинични проучвания, които потвърждават високата ефективност на арсеника при ОПЛ. Получени са и първите данни за антимиеломна активност. През март 2002 г. арсеникът е регистриран от ЕМЕА (европейската агенция по лекарствата) под търговското име Trisenox®. Trisenox® е показан за индукция на ремисия и консолидация на възрастни пациенти с рецидивирала/рефрактерна ОПЛ, характеризираща се с наличието на t(15;17) и/или наличието на фузионния ген PML-RAR α . Предходното лечение трябва да е включвало ретиноид и химиотерапия.

4.2. Фармакокинетика

Trisenox® представлява воден разтвор на As_2O_3 с концентрация 1 mg/ml. Прилага се като интравенозна инфузия с продължителност 1-2 часа в доза от 0,15 до 0,25 mg/kg в зависимост от терапевтичната схема. Пиковата плазмена концентрация (C_{max}) след приложение на 10 mg As_2O_3 е в границите между 0,5 и 2 μ M (Au and Kwong 2008). При ежедневно приложение постоянни плазмени концентрации се постигат след 8-10 дни. Резорбцията на As_2O_3 след перорално приложение е почти пълна (около 90%), но е бав-

на и C_{\max} е в границите между 0,2 и 0,6 μM . Площта под фармакокинетичната крива (AUC) обаче е сходна с тази при интравенозно приложение.

Арсеникът се метаболизира основно в черния дроб чрез метилиране първо до метиларсонова киселина и след това бързо до диметиларсинова киселина (ДМАК). Чернодробните метилази, които осъществяват това превръщане не участват в метаболизма на други лекарства. Метилираните метаболити са с по-ниска токсичност от изходното съединение. Повече от 90% от арсена се излъчват чрез бъбреците като кинетиката е двуфазна ($t_{1/2\alpha} = 2\text{-}6$ часа, $t_{1/2\beta} = 15$ дни). Отначало в урината преобладават неорганични съединения на тривалентния и петвалентния арсен, а през втората фаза – ДМАК. Арсенът се натрупва в черния дроб, бъбреците, кожата, космите, ноктите и мозъка.

4.3. Механизъм на действие

4.3.1. Индуциране на оксидативен стрес

Диарсеновият триоксид и други арсенови производни повишават нивото на реактивни кислородни радикали (РКР) в клетката, което води до увреждане на ДНК, понижаване на митохондриалния мембранен потенциал, освобождаване на цитохром *c* от митохондриите и индуциране на апоптоза (Platanias 2009; Sumi, Shinkai et al. 2010). As_2O_3 от една страна повишава образуването на РКР чрез активиране на ензимите НАДФ·Н-оксидаза и NO-синтаза, а от друга затруднява обезвреждането на РКР чрез инхибиране на ензимите глутатионпероксидаза (ГП) и тиоредоксинредуктаза (ТР). Освен това As_2O_3 инхибира дихателните вериги, което също способства за образуване на РКР (фиг. I.6).

НАДФ·Н-оксидазата е ензим, който генерира супероксидни радикали ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Арсеновите (III) йони благоприятстват активирането и транслокацията на субединицата Rac1 в плазмената мембрана (Sumi, Shinkai et al. 2010). Това е доказано както при левкемични клетки NB4, произхождащи от ОПЛ, така и при нормални ендотелни клетки от свинска аорта. Супероксидните радикали предизвикват разкъсвания в ДНК. Инхибиторите на НАДФ·Н-оксидазата и антиоксидантите намаляват цитотоксичността на As_2O_3 . Базалната активност на НАДФ·Н-оксидазата определя чувствителността на клетките към арсеник.

ГП редуцира водородния пероксид и липидните хидропероксиди, използвайки редуциран глутатион. Метилсукциновата киселина, която е инхибитор на ГП, потенцира

способността на As_2O_3 да индуцира апоптоза в клетки NB4. Диарсеновият триоксид инхибира TP чрез ковалентно модифициране на S- и Se-атоми в активния център на ензима (Sumi, Shinkai et al. 2010).

4.3.2. Повлияване на различни сигнални пътища

Оксидативният стрес оказва влияние върху регулацията на различни сигнални пътища (фиг. 1.6). По такъв механизъм диарсеновият триоксид активира сигналните пътища на митоген-активираните протеинкинази (Sumi, Shinkai et al. 2010). Активирането на JNK и p38 има проапоптотичен ефект, а на Raf/MEK/ERK – антиапоптотичен. Значението на тези сигнални пътища за As_2O_3 -индуцираната апоптоза се демонстрира от наблюденията, че предварителното приложение на глутатион или ацетилцистеин инхибира As_2O_3 -индуцираното активиране на JNK и p38 и съответно потиска апоптозата. Установено е, че в някои видове клетки JNK, а в други p38 е по-важен за предизвикването на апоптоза. Приложението на инхибитор на MEK1 пък улеснява индуцирането на апоптоза от As_2O_3 при клетки NB4, както и при миеломни клетки.

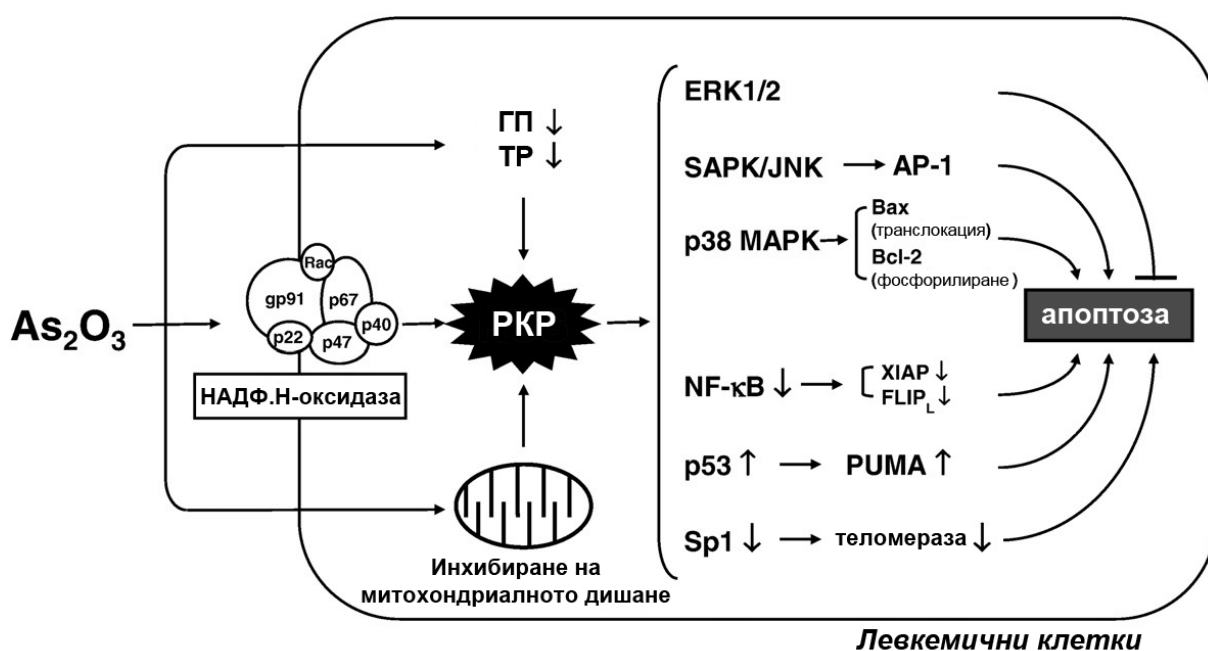
As_2O_3 може пряко да инхибира някои тирозинкинази, сред които JAK1 и JAK2. По този начин As_2O_3 потиска активирането на транскрипционните фактори STAT1, STAT3 и STAT5 (Platanias 2009).

4.3.3. Повлияване на различни транскрипционни фактори

При различни туморни клетъчни линии As_2O_3 предизвиква повишаване на експресията и фосфорилиране на p53 (Sumi, Shinkai et al. 2010). Активирането на p53 може да се обясни от една страна с индуцирането на оксидативен стрес и фосфорилирането на p38 и Chk2, които от своя страна фосфорилират p53. От друга страна, As_2O_3 инхибира фосфатазата Wip1, с което потиска дефосфорилирането на Chk2. В крайна сметка активираният p53, чрез контролираните от него гени, предизвиква спиране на клетъчния цикъл и индуциране на апоптоза чрез активиране на вътрешния апоптотичен път. При сравняване на няколко миеломни клетъчни линии обаче е установено, че клетките с мутирал p53 са по-чувствителни към As_2O_3 -индуцирана апоптоза. При тях от ключово значение е активирането на каспаза-8 и каспаза-10.

Диарсеновият триоксид инхибира свързването на транскрипционния фактор Sp1 към съответните му участъци от ДНК (Sumi, Shinkai et al. 2010). Това вероятно става поради окисляване на цистеиновите остатъци в активния център на Sp1. В резултат на това се потиска транскрипцията на гена за теломеразата и се индуцира апоптоза.

As₂O₃ активира киназата JNK, която от своя страна фосфорилира протеина c-Jun и по този начин го предпазва от убиквитинилиране и протеазомно разграждане. Протеинът c-Jun влиза в състава на комплексния транскрипционен фактор AP-1. По този начин As₂O₃ повишава активността на AP-1 и съответно транскрипцията на някои проапоптотични гени (Sumi, Shinkai et al. 2010).



Фиг. 1.6. Обобщена схема на механизмите, по които As₂O₃ индуцира оксидативен стрес и апоптоза в левкемични клетки (Sumi, Shinkai et al. 2010).

Арсенитният йон се свързва с Cys179 на киназата IKK и я инхибира (Sumi, Shinkai et al. 2010). В следствие на това транскрипционният фактор NF-κB остава секвестриран в цитоплазмата и така се потиска експресията на антиапоптотични протеини, растежни фактори, цитокини и антиоксидантни ензими като металотионеин-1. Установено е, че As₂O₃-индуцираният оксидативен стрес също може да потиска активността на NF-κB в някои видове клетки.

4.3.4. Специфични механизми в определени видове клетки

Известно е, че As_2O_3 стимулира разграждането на фузионния протеин PML-RAR α , характерен за ОПЛ (Sumi, Shinkai et al. 2010). PML-RAR α възпрепятства експресията на важни за миелоидната диференциация гени. Ето защо арсеновият триоксид може да индуцира диференциация на малигнените промиелоцити до миелоцити. Наскоро проведени изследвания показват, че клетките експресиращи PML-RAR α имат нарушена сигнална трансдукция през cAMP, с което отпада важен механизъм, инхибиращ активността на НАДФН-оксидазата (Platanias 2009). Затова As_2O_3 предизвиква много по-лесно оксидативен стрес и апоптоза в тези клетки.

As_2O_3 стимулира разграждането на фузионния протеин AML1/MDS1/EVI1, който се среща в някои случаи на ОМЛ, ХМЛ и миелодиспластичен синдром (Platanias 2009).

As_2O_3 стимулира убиквитирилирането и протеазомното разграждане на фузионния протеин Bcr-Abl, характерен за ХМЛ (Platanias 2009).

4.4. Предклинични данни за фармакологичните ефекти

As_2O_3 проявява значителна противотуморна активност спрямо клетки, произхождащи от ОПЛ и експресиращи PML-RAR α (Platanias 2009). Тази активност се проявява като стимулиране на диференциацията и индуциране на апоптоза. При концентрации на As_2O_3 под 0,5 μ M преобладава диференциацият ефект, а при по-високи – апоптотичните механизми.

As_2O_3 оказва цитотоксичен ефект и върху туморни клетки, произхождащи от други типове ОМЛ (не-ОПЛ), както и върху такива, произхождащи от други хематологични неоплазии, напр. мултиплен миелом, Ходжкинов лимфом, миелодиспластичен синдром и ХМЛ. Чувствителността на тези тумори към As_2O_3 обаче е по-ниска в сравнение с ОПЛ. Диарсеновият триоксид може да потиска свързването на миеломните клетки със СКМК, както и индуцираната от това свързване секреция на IL-6 и VEGF (Hayashi, Hideshima et al. 2002). As_2O_3 е цитотоксичен и към клетки, произхождащи от някои солидни тумори, като рак на млечната жлеза или на простатата. Тези ефекти обаче се наблюдават при твърде високи концентрации, граничещи с токсичните, при които се засягат и нормалните клетки (Platanias 2009).

Продължителното въздействие с ниски концентрации As_2O_3 стимулира пролиферацията на нормални свински ендотелни клетки. Инкубиране на нормални макрофаги с 1

$\mu\text{M As}_2\text{O}_3$ в продължение на 6 дни нарушава адхезионните им свойства и способността за фагоцитоза. Обратно, при неутрофилни гранулоцити е наблюдавано повишение на адхезията и стимулиране на миграцията и фагоцитозата след въздействие с $5 \mu\text{M As}_2\text{O}_3$ в продължение на 30-60 минути (Binet, Antoine et al. 2009).

4.5. Данни от клинични проучвания

Диарсеновият триоксид е много ефективен при ОПЛ – постига пълна ремисия в 72-85% от случаите. 87,2% от пациентите, получили ремисия след самостоятелно лечение с As_2O_3 , не претърпяват прогресия на заболяването в рамките на 3 години. Още по-добри резултати се получават в комбинация с транс-ретиноева киселина (ATRA) и конвенционални химиотерапевтични лекарства (Wang and Chen 2008).

Клинични проучвания от I и II фаза при пациенти с рецидивирал/рефрактерен ММ показват, че As_2O_3 умерено понижава и стабилизира нивото на парапротеина (Rollig and Illmer 2009). При 13-33% от пациентите парапротеинът се понижава с повече от 50%. Повечето пациенти обаче получават неутропения от трета или по-висока степен и не могат да понесат повече от 2 месеца лечение с As_2O_3 . Непрекъснатото ежедневно приложение е по-ефективно, но и по-токсично, докато прекъснатото се понася по-добре, но и резултатите са по-незадоволителни (Chng, Lau et al. 2005). В клинично проучване от I фаза е изследвана комбинация от As_2O_3 (0,25 mg/kg/ден) и аскорбинова киселина (1 000 mg/ден), прилагани 5 пъти седмично в продължение на 5 седмици, следвани от 2 седмици почивка (Verstovsek, Giles et al. 2006). Това лечение се понесло добре и довело до ремисия (понижаване на парапротеина с повече от 50%) при двама от общо 6 пациенти. Проведено е и изследване с тройна комбинация As_2O_3 /дексаметазон/аскорбинова киселина при пациенти с рецидивирал/рефрактерен ММ. Получена е пълна ремисия при 10% от пациентите (N = 20), лекувани с тази комбинация. При друго проучване комбинация от As_2O_3 (0,25 mg/kg два пъти седмично), мелфалан p.o. и аскорбинова киселина i.v. довела до терапевтичен отговор при 8 от общо 14 пациенти.

Засега е проведено само едно рандомизирано контролирано проучване на As_2O_3 при пациенти с ММ (Rollig and Illmer 2009). Изследвано е дали добавянето на As_2O_3 (0,15 или 0,25 mg/kg/ден за 7 дни) към високодозовата терапия с Melphalan преди АТХСК позволява постигане на по-добър терапевтичен резултат. Не са наблюдавани обаче зна-

чими разлики в честотата на постигане на пълна ремисия и в продължителността на живот на пациентите.

Проведените клинични проучвания от I и II фаза при пациенти с други лимфоидни неоплазии показват много ниска ефективност на As₂O₃ (Verstovsek, Giles et al. 2006). В изследванията са участвали пациенти с ОЛЛ, кожен Т-клетъчен лимфом, различни не-Ходжкинови лимфоми и левкемия причинена от HTLV-1. Терапевтична полза е наблюдавана при много малка част от пациентите, като при това е била съпроводена от значителна токсичност.

Няколко клинични проучвания свидетелстват за терапевтичен ефект на As₂O₃ при пациенти с миелодиспластичен синдром (Verstovsek, Giles et al. 2006). При отделните проучвания между 9 и 86% от пациентите са получили подобрене до степен да не се нуждаят от кръвопреливане. При ОМЛ и ХМЛ е наблюдавана краткосрочна терапевтична полза при някои от пациентите.

4.6. Фармакологичен профил на безопасност

Диарсеновият триоксид инхибира почти 200 ензими при човека. Острата летална доза е между 100 и 300 mg елементарен арсен. Симптомите при остро отравяне включват езофагит, болки в корема, диария, аритмия и обърканост. Хроничното излагане на ниски дози, както е например в районите със замърсена вода, води до последствия като хиперпигментация на кожата, невропатия, диабет, хипертония, рак на кожата, цироза на черния дроб и хепатоцелуларен карцином (Au and Kwong 2008; Plataniias 2009). Последните три от тях обаче не са наблюдавани при контролираната терапевтична употреба на As₂O₃.

Най-честите НЛР към As₂O₃ са хипергликемия, хипокалиемия, неутропения, тромбоцитопения, периферна невропатия и повишение на чернодробните трансминази (Au and Kwong 2008). Често се развива преходен хепатит от 5 до 10 дни след началото на терапията, който изисква намаляване на дозата или временно спиране на лечението. Хепатитът обикновено отшумява за около седмица, след което дозата може постепенно да се повиши. Възможно е обаче повторно развитие на хепатит по-нататък в хода на лечението. Сравнително често се наблюдават хиперпигментация на кожата и кожни обриви, които обикновено не налагат намаляване на дозата. През първата година от лечението близо 25% от пациентите получават реактивация на VZV (вирусът, причиняващ ва-

рицела и херпес зостер). Сериозна НЛР е синдромът на левкоцитна активация, който се характеризира с фебрилитет, диспнея, задръжка на течности, повишаване на телесното тегло, белодробни инфилтрати и плеврални или перикардни изливи, с или без левкоцитоза. Този синдром се среща само при ОПЛ и е характерен за първите две седмици от лечението (среща се при около половината от пациентите). При по-тежките случаи е възможен летален изход. Диарсеновият триоксид може да предизвика удължаване на QT-интервала и камерна аритмия тип „torsade de pointes” или пълен атрио-вентрикуларен блок. Предходно лечение с антрациклини може да повиши риска от удължаване на QT-интервала. As_2O_3 е ембриотоксичен, тератогенен, канцерогенен и мутагенен (Au and Kwong 2008).

4.7. Рационални комбинации с други лекарства

Комбинацията от As_2O_3 и ATRA има синергистичен ефект при ОПЛ. Това се дължи на няколко различни причини: As_2O_3 въздейства основно на протеиново ниво, а ATRA – на РНК-ниво; ATRA улеснява навлизането на As_2O_3 в клетките, тъй като повишава експресията на аквапорин-9; As_2O_3 се „прицелва” в PML-частта на фузионния протеин PML-RAR α , а ATRA – в RAR α -частта (Wang and Chen 2008). As_2O_3 повишава чувствителността на клетки от ОПЛ към TNF α (Platanias 2009).

Установено е, че аскорбиновата киселина усилва противомиеломния ефект на As_2O_3 *in vitro*. Смята се обаче, че това се дължи на наличието на свободни йони на преходни метали в средите за клетъчно култивиране, благодарение на които се проявяват прооксидантните свойства на витамин С. В плазмата медните и железните йони са свързани с протеини и преобладават антиоксидантните ефекти на аскорбиновата киселина. Витамин С повишава вътреклетъчното съдържание на глутатион и така намалява оксидативния стрес, индуциран от As_2O_3 . Изследвания при животни показват, че аскорбиновата киселина не засилва противотуморното действие на As_2O_3 , а в някои случаи дори го отслабва (Karavavvas, Carcamo et al. 2005). Комбинацията от As_2O_3 и Bortezomib има синергистичен цитотоксичен ефект срещу миеломни клетки *in vitro* (Wen, Feng et al. 2010). Потискайки сигналния път JAK/STAT, As_2O_3 преодолява предизвиканата от IL-6 резистентност на МП към дексаметазон-индуцирана апоптоза (Hayashi, Hideshima et al. 2002).

Комбинацията от As_2O_3 и Imatinib е синергистична при ХМЛ. Комбинацията от As_2O_3 и IFN- α е синергистична при ХМЛ и при Т-клетъчна левкемия (Wang and Chen 2008). As_2O_3 повишава чувствителността на глиомни клетки към TRAIL (Platanias 2009).

4.8. Обобщение и бъдещи насоки

Диарсеновият триоксид е високоефективно средство за лечение на ОПЛ. Той обаче има ограничена ефективност при пациенти с ММ, при които не е постигнат успех с други лекарства. Би следвало да се проучат ефектите от комбинирано приложение на As_2O_3 с перспективни нови противомиеломни лекарства. Интересно е да се проучи и до каква степен антимиеломната активност на As_2O_3 би могла да се повлияе негативно от разтворими фактори, секретирани в костно-мозъчната микросреда.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

1. 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 As_2O_3 , така и комбинираното им приложение с утвърдени в клиничната практика лекарства като Melphalan, Bendamustine и Bortezomib.

2. 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, As_2O_3 , 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 остеообласти 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

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

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 антиапоптоичния протеин Bcl-X_L.

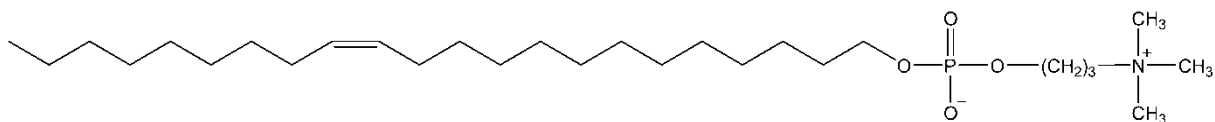
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Вещества, прилагани върху миеломните клетки

1.1.1. Вещества, изследвани за противомиеломно действие

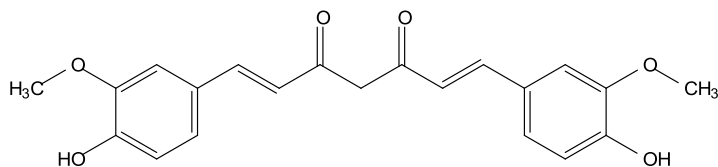
- Еруцилфосфо-N,N,N-триметилпропиламин (ErPC3, Erufosine):



$$M = 503,74 \text{ g/mol}$$

Съединението беше синтезирано и предоставено от проф. Hansjörg Eibl, Max-Planck-Institut, Гьотинген, Германия. Представява бяло прахообразно вещество. Съхранява се при +4°C. От него беше приготвян стерилен разтвор с концентрация 10 mM в смес от равни обемни части фосфатен буфер и 96%-ен етанол. Разтворът е траен и беше съхраняван при +4°C.

- Куркумин (диферулоилметан):



$$M = 368,38 \text{ g/mol}$$

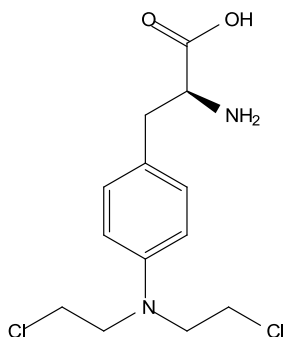
Веществото беше закупено от Sigma-Aldrich (кат. № C1386). Представява жълто-оранжев прах. Съхранява се при -20°C. От него беше приготвян стерилен разтвор с концентрация 10 mM в 96%-ен етанол. Разтворът е траен и беше съхраняван при -20°C.

➤ **Диарсенов триоксид (арсеник, As₂O₃, АТО): M = 197,84 g/mol**

Веществото беше закупено от Sigma-Aldrich (кат. № A1010). Представява бял прах. Съхранява се при стайна температура. Диарсеновият триоксид беше разтворен в малък обем концентрирана натриева основа, след което беше разреждан с фосфатен буфер до постигане на крайна концентрация 10 mM. След това разтворът беше стерилизиран чрез филтрация. Разтворът е траен и беше съхраняван при +4°C.

1.1.2. Лекарствени вещества, регистрирани за приложение при MM

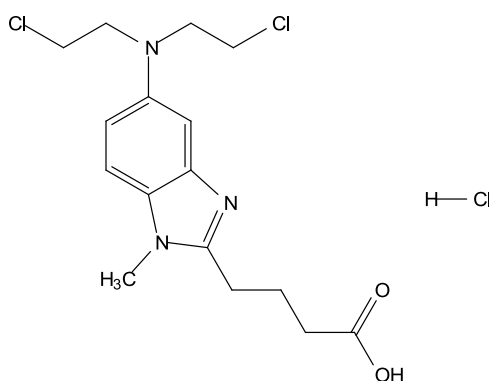
➤ **Melphalan:**



M = 305,2 g/mol

Веществото беше закупено от Sigma-Aldrich (кат. № M2011). Представява жълтеникаво-бял прах. Съхранява се при +4°C. От него беше приготвян стерилен разтвор с концентрация 10 mM в метанол. Разтворът е нетраен, поради което беше приготвян нов непосредствено преди всеки експеримент.

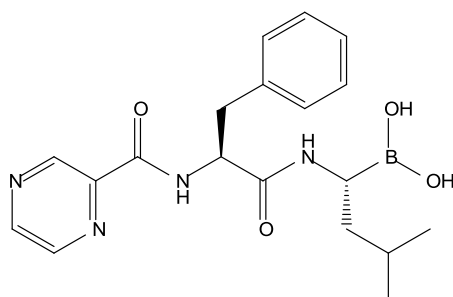
➤ **Bendamustine hydrochloride (Ribomustin®):**



M = 394,72 g/mol

Веществото беше предоставено от Astellas Pharma GmbH, Мюнхен, Германия. Представява бял прах. Съхранява се при +4°C. От него беше приготвян стерилен разтвор с концентрация 10 mM в етанол. Разтворът е нетраен, поради което беше приготвян нов непосредствено преди всеки експеримент.

➤ **Bortezomib (Velcade®):**



$$M = 384,24 \text{ g/mol}$$

Беше използван лекарственият продукт Velcade® (Janssen-Cilag, Beerse, Белгия), в който активното вещество бортезомиб е разредено с манитол в съотношение 1:10. Лекарствената форма е прах за приготвяне на инжекционен разтвор. Съхранява се при +4°C. От лекарствената форма беше приготвян стерилен разтвор в диметилсулфоксид (ДМСО), така че крайната концентрация на бортезомиб да е 1 mM. Разтворът беше съхраняван при –20°C. При тези условия активността му се запазва около 3 месеца.

1.1.3. Биологични макромолекули

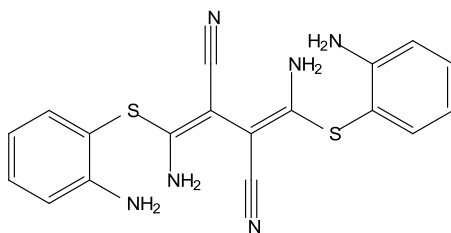
➤ **Рекомбинантен човешки интерлевкин-6 (rhIL-6)** беше закупен от STEMCELL Technologies, Ванкувър, Канада (кат. № 02506). 10 µg лиофилизиран rhIL-6 бяха разтворени в смес от 1,95 ml стерилен фосфатен буфер и 50 µl 20%-ен разтвор на човешки албумин. Така беше получен разтвор на rhIL-6 с концентрация 5 µg/ml, съдържащ и 0,5% албумин за стабилизиране на цитокина. Разтворът беше разделен на аликвотни части по 50 µl и беше съхраняван при –20°C.

➤ **Рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN)** беше закупен от EMP Gene-tech, Инголщадт, Германия. Продуктът беше получен под форма на разтвор с концентрация 250 µg/ml, след което беше разделен на малки порции. Остеопонтинът беше съхраняван при –20°C.

➤ **Фибронектин, добит от човешка плазма**, беше закупен от Sigma-Aldrich (кат. № F0895). Продуктът е под форма на разтвор с концентрация 1 mg/ml и се съхранява при 2-8°C.

1.1.4. Инхибитори на сигналната трансдукция

➤ **U0126 (инхибитор на MEK1/2):**



$$M = 380,49 \text{ g/mol}$$

Веществото беше закупено от Cell Signaling Technology, Бевърли, САЩ (кат. № 9903). Представява бял прах. Съхранява се при -20°C. От него беше приготвен стерилен разтвор с концентрация 10 mM в ДМСО. Разтворът беше разделен на аликвотни части и също беше съхраняван при -20°C.

1.2. Клетъчни линии

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

➤ **U-266 (DSMZ № ACC 9)**

- *Клетъчен тип:* човешки мултиплен миелом.
- *Произход:* изолирана през 1968 г. от периферната кръв на 53-годишен мъж с мултиплен миелом тип IgE λ в терминална фаза (Nilsson, Bennich et al. 1970).
- *Морфология:* кръгли или многоъгълни, единични или скупчени клетки, растящи в суспензия. Част от клетките проявяват адхерентен растеж. Могат да се отделят механично.
- *Подходяща среда за отглеждане:* 90% RPMI-1640 + 10% FBS (фетален телешки серум).
- *Условия на отглеждане:* 37°C, 5% CO₂.
- *Време на удвояване:* около 55 часа.

- *Цитогенетика*: сложен хиподиплоиден кариотип с 6,5% полиплоидия.
- *Вируси*: EBV –, HBV –, HCV –, HIV –, HTLV-I/II –, SMRV –.
- *Характерни особености*: метилиран *P16INK4A*; мутирал *p53*; секреция на TNF- β и IL-6; секреция на IgE λ .

➤ **OPM-2 (DSMZ № ACC 50)**

- *Клетъчен тип*: човешки мултиплен миелом.
- *Произход*: изолирана през 1982 г. от периферната кръв на 56-годишна жена с мултиплен миелом тип IgG λ в терминална левкемична фаза (Katagiri, Yonezawa et al. 1985).
- *Морфология*: кръгли или многоъгълни клетки, растящи в суспензия.
- *Подходяща среда за отглеждане*: 90% RPMI-1640 + 10% FBS.
- *Условия на отглеждане*: 37°C, 5% CO₂.
- *Време на удвояване*: между 30 и 60 часа.
- *Цитогенетика*: сложен хипертриплоиден/хипотетраплоиден кариотип с 6,5% полиплоидия.
- *Вируси*: EBV –, HBV –, HCV –, HHV-8 –, HIV –, HTLV-I/II –, SMRV –.
- *Характерни особености*: t(4;14)(p16.3;q32.3) и наличие на хибридни транскрипти *IGH-FGFR3-MMSET*; мутирал *p53*; секреция само на λ -леки имуноглобулинови вериги.

➤ **RPMI-8226 (DSMZ № ACC 402)**

- *Клетъчен тип*: човешки мултиплен миелом.
- *Произход*: изолирана през 1966 г. от периферната кръв на 61-годишен мъж с мултиплен миелом тип IgG λ , при поставяне на диагнозата (Matsuoka, Moore et al. 1967).
- *Морфология*: единични клетки със смесен суспензионен/адхерентен растеж. Адхериралите клетки могат да се отделят механично.
- *Подходяща среда за отглеждане*: 90% RPMI-1640 + 10% FBS.
- *Условия на отглеждане*: 37°C, 5% CO₂.
- *Време на удвояване*: около 60-70 часа.
- *Цитогенетика*: хипотриплоиден кариотип с 7,5% полиплоидия.
- *Вируси*: EBV –, HBV –, HCV –, HIV –, HTLV-I/II –, SMRV –.
- *Характерни особености*: метилиран *P16INK4A*; мутирал *p53*; експресия на TGF- β и c-MAF; секреция само на λ -леки имуноглобулинови вериги.

➤ **SAOS-2 (DSMZ № ACC 243)**

- *Клетъчен тип*: човешки остеогенен сарком.
- *Произход*: изолирана през 1973 г. от първичен остеогенен сарком на 11-годишно момиче (Fogh 1975).
- *Морфология*: адхерентни епителоподобни клетки, растящи в монослой. Клетките се отделят чрез трипсиниране.
- *Подходяща среда за отглеждане*: 85% McCoy's 5A + 15% FBS или 90% RPMI-1640 + 10% FBS.
- *Условия на отглеждане*: 37°C, 5% CO₂.
- *Време на удвояване*: около 43 часа.
- *Цитогенетика*: хипердиплоиден кариотип с 16% полиплоидия.
- *Вируси*: EBV –, HBV –, HCV –, HHV-8 –, HIV –, HTLV-I/II –, SMRV –.

➤ **SKW-3 (DSMZ № ACC 53)**

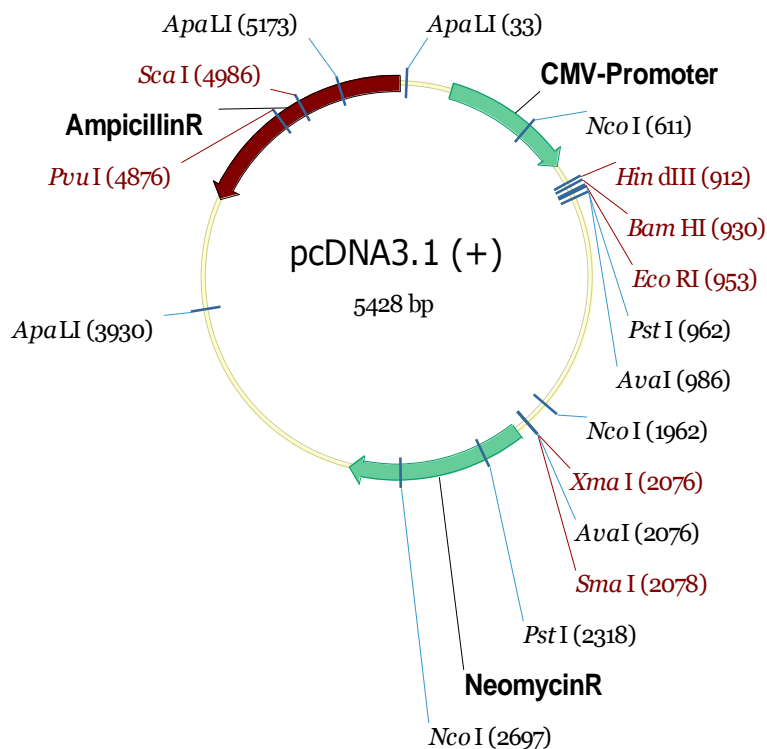
- *Клетъчен тип*: човешка Т-клетъчна левкемия.
- *Произход*: изолирана през 1977 г. от периферната кръв на 61-годишен мъж с Т-клетъчна хронична лимфоцитна левкемия. По-късно е установено кръстосано замърсяване с клетъчната линия KE-37, изолирана през 1979 г. от 27-годишен мъж с остра лимфобластна левкемия.
- *Морфология*: единични кръгли клетки, растящи в суспензия.
- *Подходяща среда за отглеждане*: 90% RPMI-1640 + 10% FBS.
- *Условия на отглеждане*: 37°C, 5% CO₂.
- *Време на удвояване*: около 30-40 часа.
- *Цитогенетика*: почти диплоиден кариотип с 4% полиплоидия.
- *Вируси*: EBV –, HBV –, HCV –, HHV-8 –, HIV –, HTLV-I/II –, SMRV –.
- *Характерни особености*: t(8;14)(q24;q11) със засягане на гена *MYC-TCRA*; делеция на *P15INK4B* и *P16INK4A*.

1.3. Кръв от умбиликална вена

Кръв от умбиликална вена ни беше предоставена от доц. Пламен Тодоров от Ин Витро АГ Медицински Център „Димитров“. Кръвта е била получена от три родилки след дадено информирано съгласие от тяхна страна. Получената кръв беше обработена незабавно по методиката описана по-нататък в точка 2. на настоящата глава.

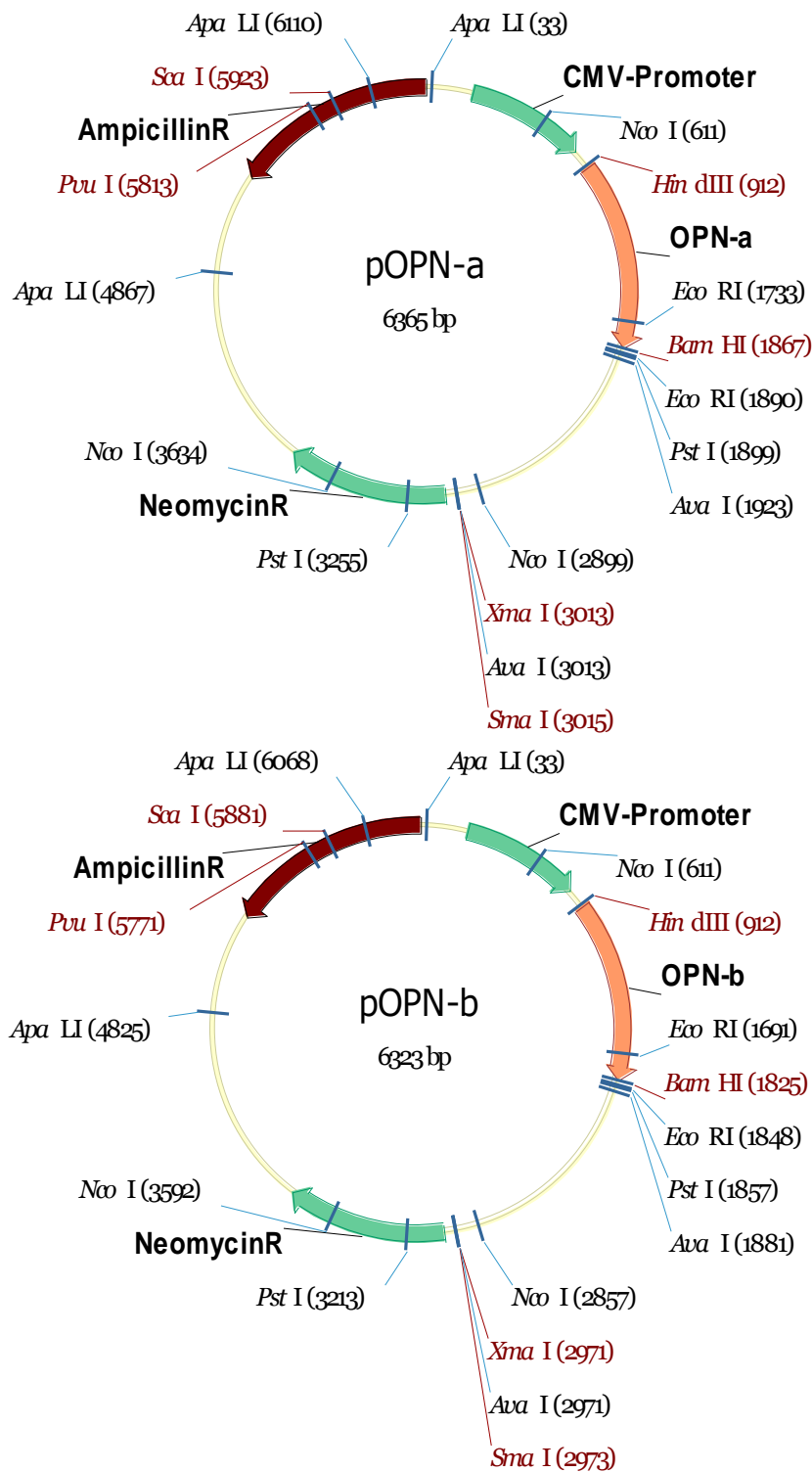
1.4. Генетичен материал, използван при провеждане на трансфекционни експерименти

➤ Плазмиден вектор pcDNATM3.1(+) (Invitrogen; кат. № V790-20). Векторът съдържа промотор от цитомегаловирус (CMV), който промотор осигурява интензивна транскрипция на следващия го ген. Векторът носи гени обуславящи резистентност към ампицилин и неомисин. Условия на съхранение: –20°C.



Фиг. III.1. Карта на плазмидния вектор pcDNATM3.1(+). Плътните стрелки изобразяват съдържащите се в плазмиди гени и функционални елементи и тяхната посока. Надписани са с пътен шрифт. Местата за рестрикция са указани със сини напречни черти, заедно с името на съответната рестриктаза и поредния номер на нуклеотида, след който се осъществява срязването на ДНК-молекулата. Имената на рестриктазите, които могат да срежат плазмиди на едно-единствено място са дадени в кафяв цвят.

➤ Плазмиди рOPN-a и рOPN-b, получени чрез клониране съотв. на ген за синтез на човешки OPN-a или OPN-b във вектора pcDNA3.1(+), в участъка между местата за рестрикция от ензимите HindIII и BamHI (фиг. III.2.). Клонирането беше извършено от д-р Christina Reufsteck (DKFZ, Хайделберг, Германия).



Фиг. III.2. Карти на плазмидите pOPN-a (горе) и pOPN-b (долу). Плътните стрелки изобразяват съдържащите се в плазмиди гени и функционални елементи и тяхната посока. Надписани са с плътен шрифт. Местата за рестрикция са указани със сини напречни черти, заедно с името на съответната рестриктаза и поредния номер на нуклеотида, след който се осъществява срязването на ДНК-молекулата. Имената на рестриктазите, които могат да срежат плазмиди на едно-единствено място са дадени в кафяв цвят.

- Block-iTTM (Invitrogen; кат. № 2013) – флуоресциращ олигонуклеотид (химически модифицирана двойно-верижна РНК, белязана с флуоресцеин), използван за оценка на ефективността на трансфекцията и оптимизиране на трансфекционните условия. Концентрация: 20 μМ. Условия на съхранение: –20°C.
- copGFP Control Lentiviral Particles (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-108084) – контролни лентивирусни частици, носещи промотор от цитомегаловирус (CMV) и ген за синтез на зелено-флуоресциращия протеин copGFP. Съхраняват се при –80°C.
- Control shRNA Lentiviral Particles (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-108080) – контролни лентивирусни частици, носещи ген за контролна РНК-секвенция, която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК. Съхраняват се при –80°C.
- Bcl-x_L shRNA (h) Lentiviral Particles (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-43630-V) – лентивирусни частици, носещи ген за интерферираща РНК насочена срещу иРНК за човешки Bcl-X_L. Съхраняват се при –80°C.

1.5. Други

Останалите материали (апаратурата и консумативите, използвани при: работа с клетъчни култури; определяне на физиологичните параметри на клетките; изготвяне и анализ на микроскопски препарати; провеждане на имуноблот; изследване на клетъчното ДНК-съдържание по метода на Nicoletti; установяване на олигонуклеозомна ДНК-фрагментация; изолиране на лизатни фракции, съдържащи мембранни липидни рафтове; анализ на вътреклетъчното натрупване на арсен; провеждане на RT-PCR и на трансфекционни експерименти) са представени подробно в приложение I. Там са дадени и съставите на използваните разтвори и буфери.

2. Методи

2.1. Култивиране на туморни клетки

Отглеждането на клетъчни култури изисква спазване на асептични условия на работа, за да не се допусне замърсяване с други организми като бактерии или дрожди. Затова всички манипулации с клетките, както и с материалите влизащи в пряк досег с тях, бяха извършвани при асептични условия в ламинарен бокс, осигуряващ постоянен поток на стерилен въздух чрез система от филтри. Материалите и разтворите, които бяха приготвяни от нас и позволяваха това, бяха автоклавираны предварително при 121°C в продължение на 30 мин. Всички предмети бяха дезинфекцирани със 70%-ен етанол преди внасяне в ламинарния бокс.

Култивирането на клетките беше провеждано съгласно следните протоколи:

2.1.1. Приготвяне на хранителна среда

1. Към 500 ml среда RPMI-1640 се добавят 56,2 ml топлинно инактивиран фетален телешки серум (56°C за 30 минути) и 5,62 ml разтвор на L-глутамин (200 mM).

2. 5 ml от така приготвената среда се поставят в матрак, който се оставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

3. Бутилката с готовата среда се съхранява в хладилник при 4°C.

4. На следващия ден матракът се проверява за наличие на микробен растеж. Ако няма такъв, средата може да се използва за култивиране на клетки. 15 минути преди употреба бутилката се изважда от хладилника и се поставя във водна баня при 37°C.

2.1.2. Размразяване на криоконсервирани клетки

1. Взима се епруветка със замразени клетки (съхранявани при -80°C или -150°C) и се поставя при 37°C до размразяване на клетъчната суспензия.

2. Клетъчната суспензия се прехвърля в центрофужна епруветка и се центрофугира 5 минути при 1 500 об./мин.

3. Надстоящата течност се изсмуква, а утайката се ресуспендира в 1 ml хранителна

среда, предварително затоплена до 37°C.

4. В малък матрак (25 cm²) се отпипетират 4 ml среда, предварително затоплена до 37°C, след което се добавя клетъчната суспензия и сместа се хомогенизира. Ако клетъчната линия е OPM-2, се добавят и 555 µl FBS, така че крайната концентрация на FBS да е 20%.

5. Матракът се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

6. През следващата една седмица към клетките се добавя по малко прясна хранителна среда, като се внимава суспензионните клетки да не се разреждат повече от допустимото (0,3-0,4.10⁶ кл./ml). Към клетки OPM-2 се добавя и FBS, така че концентрацията му в средата да се поддържа на 20%.

2.1.3. Поддържане на клетките в експоненциална фаза на растеж

Протоколът е различен в зависимост от това дали се касае за адхерентни клетки, каквито са SAOS-2, или за суспензионни, каквито са останалите използвани клетъчни линии.

➤ Суспензионни клетки:

1. На всеки два дни от матраците се отстраняват 1/2 до 2/3 от обема на клетъчната суспензия и се прибавя хранителна среда, в количество равно на отстраненото. Когато част от клетките са залепнали за дъното на матрака (характерно за U-266 и RPMI-8226) те трябва първо да се отлепят чрез остъргване с подходящ за целта инструмент. Внимава се клетките да не се разреждат повече от допустимото (0,3-0,4.10⁶ кл./ml).

2. Отстранената клетъчна суспензия може да се изхвърли, да се използва за заселване на нов матрак или да се подготви за замразяване (т. 2.1.4.). Във втория случай, след прехвърлянето ѝ в нов матрак, към нея се добавя толкова хранителна среда, така че гъстотата на клетките да е около 0,3-0,4.10⁶ кл./ml.

3. Ако клетъчната суспензия е станала жълта на цвят, е необходима цялостна подмяна на средата, което се постига чрез центрофугиране (5 мин при 1 500 об./мин) и последващо ресуспендиране на утайката от клетки в прясна хранителна среда.

➤ Адхерентни клетки (SAOS-2):

1. При достигане на висока степен на конfluентност на клетките (над 90%), старата среда се изсмуква.

2. Монослоят от клетки се промива с 5-10 ml стерилен фосфатен буфер (PBS).

3. Фосфатният буфер се изтегля и към клетките се добавя 0,25%-ен разтвор на трипсин (2,5 ml за малък матрак или 5 ml за средно голям от 75 cm²).
4. Матракът се оставя в инкубатора и се наблюдава през няколко минути до отлепяне на клетките от дъното. Процесът може да се ускори чрез потупване на дъното с ръка.
5. Добавя се равен обем хранителна среда, съдържаща FBS, за да се прекрати действието на трипсина и да не се увредят клетките.
6. Определя се гъстотата на клетките чрез хемоцитометър на Neubauer.
7. Необходимото количество клетъчна суспензия се прехвърля в центрофужна епруветка и се центрофугира 5 минути при 1 500 об./мин.
8. Надстоящата течност се изтегля, след което клетките се ресуспендират в нужното количество хранителна среда, така че да се постигне гъстота от около 0,1-0,2.10⁶ кл./ml.
9. Клетъчната суспензия се прехвърля в матрак за култивиране, който след това се поставя в инкубатора.

2.1.4. Криоконсервиране на клетки

1. Приготвя се среда за замразяване на клетки със състав 90% FBS и 10% ДМСО и се държи при 4°C, докато дойде моментът за употребата ѝ.
2. Клетъчната култура се наблюдава под фазово-контрастен инвертен микроскоп, за да се потвърди отсъствието на контаминация.
3. Клетъчната суспензия се хомогенизира, съотв. адхерентните клетки се трипсинират по процедурата, описана в т. 2.1.3., след което се определя гъстотата на клетките.
4. Епруветките за замразяване се надписват предварително.
5. Клетъчна суспензия в количество, съдържащо желан брой клетки, се центрофугира 5 минути при 1 500 об./мин.
6. Надстоящата течност се изтегля, а утайката се ресуспендира в среда за замразяване до крайна гъстота 5.10⁶ кл./ml (суспензионни клетъчни линии) или 2.10⁶ кл./ml (адхерентни клетъчни линии).
7. Във всяка от приготвените епруветки за замразяване се разпределя по 1 ml от получената клетъчна суспензия. Работи се бързо.
8. Епруветките се подлагат на замразяване – подреждат се в специална кутия за замразяване, която се поставя във фризер, поддържащ -80°C. Така температурата в епруветките се понижава постепенно с 1°C/мин до -80°C.

9. На следващия ден епруветките със замразените клетки се изваждат от кутията и се прехвърлят във фризер, поддържащ -150°C .

2.1.5. Култивиране в обща среда на физически разделени едни от други миеломни клетки U-266 и остеобластни SAOS-2

1. Приготвя се суспензия от клетки SAOS-2 с гъстота 1.10^6 кл./ml. Тя се разпределя по 0,5 ml в 6 ямки на 24-ямкова плака.

2. Плаката се поставя в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност на въздуха.

3. След прилепване на клетките към дъното, в три от ямките внимателно се поставя по един стерилен поликарбонатен филтър Millicell®-PCF с диаметър на порите 0,4 μm така, че долната му част с мембраната да е потопена изцяло в течната среда.

4. Приготвя се суспензия от клетки U-266 с гъстота 1.10^6 кл./ml. От нея се прехвърлят по 500 μl в пространството над мембраната на всеки филтър, както и по 1 ml в 2 или 3 празни ямки.

5. Плаката се връща в инкубатора.

6. Четиридесет и осем часа по-късно култивирането приключва и се взимат отделни проби за имуноблот (т. 2.7.1.) от двата вида клетки, както от ямките за съвместно култивиране, така и от контролните ямки за самостоятелно култивиране.

2.1.6. Триизмерно клетъчно култивиране във въртящи се биореактори

1. Един биореакторен модул Synthescon® се запълва със суспензия от клетки SAOS-2 в хранителна среда. Нужни са около 10-11 ml с гъстота $0,3.10^6$ кл./ml.

2. Биореакторният модул се прикрепва към въртящото устройство и заедно с него се поставя в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност на въздуха. Пуска се да се върти на бавни обороти.

3. След 24 часа започва да се наблюдава формиране на малки сфероиди от клетки SAOS-2. В хода на времето те нарастват на големина, стават по-тежки и започват да падат в периферията на съда. В такъв случай скоростта на въртене се усилва, така че сфероидите да се намират в състояние на относителна безтегловност и да запазват траектория, близка до центъра на биореакторния модул.

4. Четиридесет и осем часа след началото, средата в биореактора се опреснява като се изтеглят 5 ml от нея и се заместват със същия обем прясна хранителна среда.

5. На 72-ия час от началото напълно се изтегля наличната в биореактора среда, като се внимава да не се изтеглят и сфероидите от клетки. Биореакторът се запълва с 10-11 ml прясна хранителна среда или суспензия от миеломни клетки в хранителна среда ($0,03 \cdot 10^6$ кл./ml).

6. На 120-ия час от началото култивирането приключва. Сфероидите от клетки се изваждат от биореактора и се подлагат на имунохистохимичен анализ (т. 2.8.).

2.2. Изолиране на мононуклеарни клетки чрез градиентно центрофугиране

Беше използван методът на центрофугиране в плътностен градиент, при което клетките се разделят на фракции в зависимост от теглото и формата си.

Изолирането на мононуклеарни клетки от костно-мозъчен аспират от пациенти с ММ беше извършвано съгласно следния протокол:

1. В две стерилни 15-милилитрови центрофужни епруветки се отпипетират по 5 ml Ficoll-Paque™ PLUS.

2. Три милилитра костно-мозъчен аспират се смесват със 6 ml фосфатен буфер. По 4,5 ml от получената смес се наслояват много бавно върху петте милилитра Ficoll-Paque. За целта е най-удобно да се използва спринцовка с подходяща игла.

3. Епруветките се центрофугират 30 минути при $400 \times g$ (1 750 об./мин с ротор 220.97 на Hermle).

4. Получените бели пръстени от мононуклеарни клетки (фиг. III.3.) се засмукват внимателно с пипета и се прехвърлят в нова епруветка. Разреждат се с фосфатен буфер в съотношение 1:3.

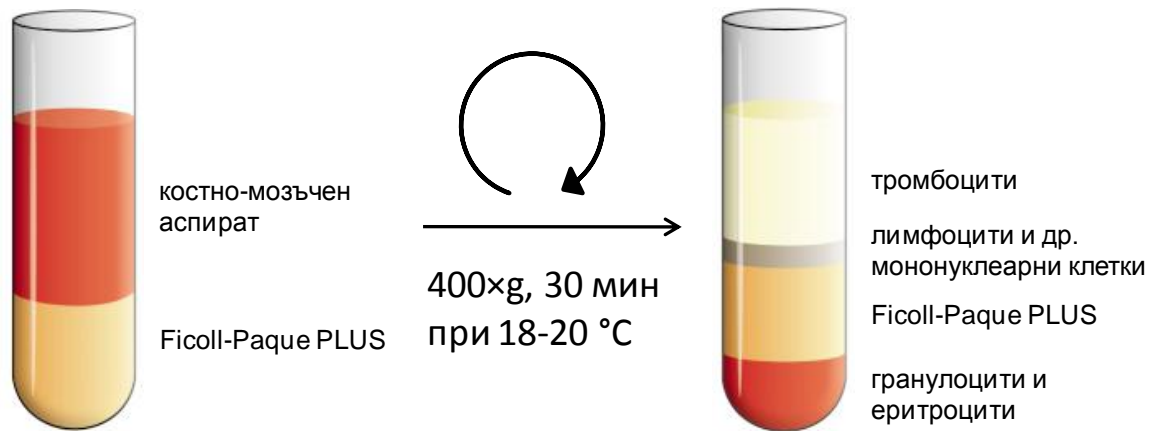
5. Изолираните мононуклеарни клетки се преброяват с камера на Neubauer.

6. Клетките се центрофугират 10 минути при $150 \times g$ (1 500 об./мин с ротор F-45-12-11).

7. Надстоящата течност се изтегля, а клетките се ресуспендират в нужното количество хранителна среда.

За изолиране на мононуклеарни клетки от кръв от умбиликална вена беше използван същият протокол с модификация в стъпка 2. – бяха смесвани 4,5 ml кръв с 4,5 ml фосфатен буфер. Така бяха изолирани клетки от предоставена кръв от три раждания.

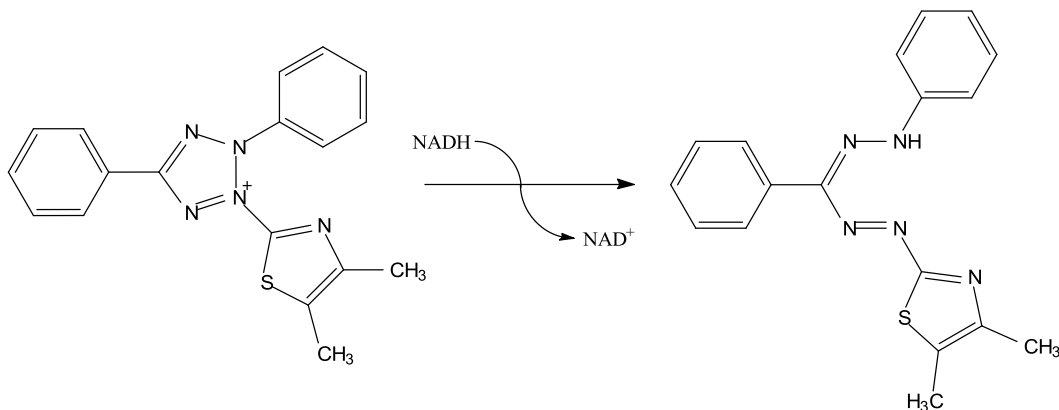
След това трите проби от изолирани мононуклеарни клетки бяха замразени според процедурата, описана в т. 2.1.4., по около $20 \cdot 10^6$ клетки на епруветка.



Фиг. III.3. Фракциониране на костно-мозъчен аспират чрез градиентно центрофугиране.

2.3. МТТ-метод за оценяване на виталността и пролиферативната активност на клетъчните култури

През 1983 г. Mosmann описва колориметричен метод, основан на редукцията на тетразолиевата сол МТТ под действие на митохондриалните дехидрогенази в живите клетки (Mosmann 1983). Дехидрогеназите трансформират МТТ до водонерастворими виолетови формаза нови кристали (фиг. III.4.) в количества, право пропорционални на броя на жизнеспособните клетки. Абсорбцията на пробите при 550 nm е мярка за концентрацията на формаза и съответно за броя на жизнеспособните клетки. Абсорбцията на пробите може да се представи като процент от тази на контролата.



Фиг. III.4. Редукция на тетразолиевата сол МТТ до формаза

МТТ-методът беше прилаган за оценяване на виталността и пролиферативната активност на клетки, подложени на въздействие с различни вещества или комбинации от вещества. При това беше спазван следният протокол:

1. Клетъчна суспензия, доведена до гъстота $0,2 \cdot 10^6$ кл./ml с прясна хранителна среда ($10 \cdot 10^6$ кл./ml за първични култури от миеломни клетки), се разпределя в 96-ямкови микротитърни плаки в обем по 100 μ l/ямка, като за целта се използва полуавтоматична пипета Eppendorf, подходяща за разпределяне на голям обем течност на множество аликвотни части. За всяка отделна група проби, вкл. нетретираната контрола, се предвиждат между 8 и 16 ямки. Остава се една свободна ямка за празна проба (чиста среда без клетки) при спектрофотометричното измерване.

2. Плаките се оставят за 24 часа в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност, за да може клетките да преодолеят стреса от прехвърлянето и отново да влязат в експоненциална фаза на растеж.

3. След изтичане на 24-те часа се приготвят разтвори на изследваните вещества с такива концентрации, че при прибавяне на 2 μ l от тях към 100 μ l клетъчна суспензия да се постигне желаната крайна концентрация.

4. Клетките се третира с полуавтоматична пипета Eppendorf, като във всяка ямка се отпипетират по 2 μ l от съответния разтвор.

5. Плаките се оставят за 48 или 72 часа в инкубатора.

6. Третираните клетки се проверяват ежедневно под фазово-контрастен микроскоп за наличие на контаминация и ако се установи такава, пробите се изхвърлят.

7. След изтичане на определеното време, във всяка ямка се отпипетират по 10 μ l разтвор на МТТ.

8. Плаката се инкубира 3 часа при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

9. За разтваряне на образувалите се формазанови кристали, във всяка ямка се отпипетират по 110 μ l 5%-ен разтвор на мравчена киселина в изопропилов алкохол и се разбърква добре до разтваряне на всички формазанови кристали.

10. В свободна ямка се приготвя празна проба като се смесват 100 μ l хранителна среда, 10 μ l разтвор на МТТ и 110 μ l 5%-ен разтвор на мравчена киселина в изопропилов алкохол.

11. Ако в ямките има мехурчета, те се отстраняват с помощта на връхче, натопено в изоамилов алкохол, за да не попречат на точното измерване на абсорбцията.

12. Плаката се разклаща в продължение на 10 s.

13. Измерва се абсорбцията при дължина на вълната 550 nm.

14. Получените опитни резултати се обработват чрез статистически методи с помощта на програмата GraphPad Prism 5.0. Най-напред се изчислява фракцията на жизнеспособните/преживелите клетки в отделните експериментални групи спрямо нетретираната контролна група, като съотношение между средните абсорбции на съответните проби, изразено в проценти:

$$SF = \frac{A_{\text{проба}} - A_{\text{празна проба}}}{A_{\text{контрола}} - A_{\text{празна проба}}} \times 100$$

След това се определят стандартните отклонения на получените резултати. Прави се анализ за значимостта на различията между отделните групи чрез непараметричния статистически тест на Mann-Whitney. След нелинеен регресионен анализ се получава графика на зависимостта концентрация-ефект. Извежда се и зависимостта $\lg(\text{концентрация})$ -ефект, от която се изчислява IC_{50} -стойността на изследваното вещество спрямо съответните клетки. Определя се и 95% доверителен интервал на IC_{50} .

В случаите, когато клетките са третирани едновременно с две различни вещества, се прави оценка на комбинационния ефект по метода на Webb (Webb 1963). Опитно наблюдаваните стойности за преживяемостта на клетките, третирани с комбинацията ($SF_{A+B(\text{набл.})}$), се сравняват с очакваните стойности за преживяемостта на клетките, които биха били отчетени, ако дадена комбинация се характеризира с адитивен ефект ($SF_{A+B(\text{оч.})}$). Тези очаквани стойности се изчисляват 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:

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

Стандартното отклонение (S) на очакваните стойности за преживяемостта се изчислява по формулата:

$$S_{A+B(\text{оч.})}^2 = S_A^2 \times S_B^2 + S_A^2 \times SF_B^2 + S_B^2 \times SF_A^2$$

Като критерий за значимостта на различията между ($SF_{A+B(\text{набл.})}$) и ($SF_{A+B(\text{оч.})}$) се приема незастъпването на техните 95% или 99% доверителни интервали – съотв. $P < 0,05$ или $P < 0,01$. Ако при $P < 0,05$ експериментално получената стойност за преживяемостта е под 70% от очакваната, комбинационният ефект се квалифицира като потенциращ

синергизъм, а ако е над 130% от очакваната – като антагонизъм. Ако са използвани само по една или две различни концентрации от всяко вещество е най-удачно резултатите да се представят под форма на стълбчеста диаграма.

Алтернативен начин за представяне на комбинационните ефекти, но базиран на същия принцип, е възможен в случаите когато концентрацията на едното вещество (напр. А) е една и съща, а се варира само концентрацията на другото вещество (В). В този случай $SF_{A+B(\text{набл.})}$ може да се изчисли не спрямо нетретираната контрола, а спрямо контролата, третирана само с веществото А. При този начин на представяне и при наличие на адитивно взаимодействие, кривата концентрация-ефект за комбинацията ще лежи върху кривата концентрация-ефект за веществото В. Ако комбинацията има по-силен цитотоксичен ефект, отколкото може да се очаква при адитивно сумиране на ефектите на двете вещества, то кривата концентрация-ефект за комбинацията ще лежи под кривата концентрация-ефект за веществото В, като отново значима разлика в стойностите по-голяма от 30% се приема за критерий за потенциращ синергизъм. Ако комбинацията има по-слаб цитотоксичен ефект, отколкото може да се очаква при адитивно сумиране на ефектите на двете вещества, то кривата концентрация-ефект за комбинацията ще лежи над кривата концентрация-ефект за веществото В, като отново значима разлика в стойностите по-голяма от 30% се приема за критерий за антагонизъм.

По-особено беше изпълнението на МТТ-метода в случаите, когато беше изследвано повлияването на химиочувствителността на миеломни клетки под действие на кондиционирана среда от друга клетъчна линия (среда, в която е отглеждана друга клетъчна линия):

1. Клетките за получаване на кондиционирана среда се засяват при първоначална гъстота $0,5 \cdot 10^6$ кл./ml (миеломни клетки) или $2,67 \cdot 10^4$ кл./cm² (SAOS-2) в един или няколко матрака.

2. Матраците се поставят в инкубатор при стандартни условия (37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха). Периодично се добавя още хранителна среда във всички матраци до запълване на допустимия им обем. Култивирането продължава до достигане на максимална гъстота на суспензионните клетки или до 100% конfluентност на адхезионните клетки.

3. Културалната среда от всички матраци се прехвърля в една или няколко центрофужни епруветки. Те се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.

4. Надстоящата течност от всяка епруветка се прекарва през филтър с диаметър на

порите 0,4 μm и се прехвърля в нова епруветка. Може да се замрази при -80°C .

5. Клетките, подлежащи на изследване, се довеждат до гъстота $0,4 \cdot 10^6$ кл./ml с прясна хранителна среда и се разпределят в 96-ямкови микротитърни плаки в обем по 100 μl /ямка, като за целта се използва полуавтоматична пипета Eppendorf, подходяща за разпределяне на голям обем течност на множество аликвотни части. За всяка отделна група проби, вкл. нетретираната контрола, се предвиждат между 8 и 16 ямки. Остава се една свободна ямка за празна проба (чиста среда без клетки) при спектрофотометричното измерване.

6. Плаките се оставят за 24 часа в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност, за да може клетките да преодолеят стреса от прехвърлянето и отново да влязат в експоненциална фаза на растеж.

7. След изтичане на 24-те часа и след хомогенизиране се изтеглят по 50 μl от съдържанието на всяка ямка. В ямките, определени за нетретирани контроли и за контроли, третирани само с цитостатик, се прибавят по 50 μl кондиционирана среда от същата клетъчна линия. В ямките, определени за контроли, изложени само на действието на кондиционирана среда от друга клетъчна линия, както и в ямките, определени за изследване на комбинационния ефект, се прибавят по 50 μl кондиционирана среда от другата клетъчна линия.

8. Приготвят се разтвори на изследваното вещество с такива концентрации, че при прибавяне на 2 μl от тях към 100 μl клетъчна суспензия да се постигне желаната крайна концентрация. Определените ямки се третират с по 2 μl от съответния разтвор.

9. Следва се стандартния протокол за МТТ-метода, започвайки от стъпка 5. нататък.

МТТ-методът беше използван и за оценяване на жизнеспособността на клетки след трансфекция. В случая бяха взимани аликвоти по 100 μl от трансфектираните и от контролните клетки и бяха засадени в 96-ямкова плака. Веднага след това във всяка ямка бяха отпипетирани по 10 μl разтвор на МТТ. След това беше следван стандартния протокол за МТТ-метода, започвайки от стъпка 8. нататък. Същата схема на работа беше прилагана и за оценяване на преживяемостта на клетките, третирани с Erufosine при провеждане на миграционен тест (т. 2.5.). В случая бяха взимани аликвоти по 100 μl от клетъчните суспензии от немигрирали клетки, третирани или не, останали в горните отсеци на филтрите за изследване на миграцията.

2.4. Оценяване на клоногенността на хемопоетични прогени- тори, изолирани от умбиликална кръв

За да поемат по пътя на диференциацията и да образуват съответни по тип колонии *in vitro*, хемопоетичните стволови клетки се нуждаят от специална полутвърда хранителна среда, обогатена с растежни и диференциращи фактори. Такава среда е MethoCult® GF H4434, която осигурява оптимален растеж на еритроидните прогенитори (CFU-E и BFU-E), гранулоцитно-макрофагеалните прогенитори (CFU-GM, CFU-M и CFU-G) и мултипотентните гранулоцитно-еритроидно-макрофагеално-мегакариоцитни прогенитори (CFU-GEMM). Средата се съхранява при -20°C , но не бива да бъде многократно размразявана и замразявана. Ето защо, след размразяване и цялостно разбъркване чрез интензивно разклащане в продължение на 1-2 минути, тя беше порционирана на аликвотни части по 1,2 ml в стерилни епруветки и замразена при -20°C .

Самият експеримент за оценка на клоногенността беше проведен съгласно следния протокол:

1. Взима се епруетка със замразени моноклеарни клетки от умбиликална кръв и се поставя при 37°C до размразяване на клетъчната суспензия.
2. Клетъчната суспензия се прехвърля в центрофужна епруетка и се центрофугира 5 минути при 1500 об./мин.
3. Надстоящата течност се изсмуква, а утайката се ресуспендира в хранителна среда RPMI-1640, обогатена с FBS (крайна концентрация 10%) и предварително затоплена до 37°C , така, че гъстотата на клетките да е около $4-5 \cdot 10^6$ кл./ml.
4. Получената клетъчна суспензия се разпределя по 1,5 ml в ямките на 24-ямкова плака.
5. Плаката се инкубира 24 часа при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност на въздуха.
6. След изтичане на 24-те часа, клетките се третират със съответните вещества в определени концентрации като се оставят и нетретирани контроли.
7. Плаката се оставя в инкубатора за още 24 часа. Необходимият брой епруветки с по 1,2 ml MethoCult® GF H4434 (по една епруетка на ямка) се изваждат от фризера и се преместват в хладилник при $+4^{\circ}\text{C}$, за да се размразят постепенно до следващия ден.
8. След изтичане на 24-те часа, клетките се преброяват и от всяка експериментална група се приготвя клетъчна суспензия с гъстота $0,5 \cdot 10^6$ кл./ml чрез разреждане с течна

хранителна среда.

9. Епруветките с размразената среда MethoCult® GF H4434 се надписват и към всяка се прибавят 120 µl от съответстващата й клетъчна суспензия, получена в стъпка 8.

10. Съдържанието на епруветките се размесва добре чрез „вортексиране”, след което епруветките се оставят в покой от 2 до 5 минути, за да се премахнат образувалите се мехурчета.

11. С помощта на спринцовка (1 ml) и игла (16G), от всяка епруветка се прехвърлят по 300 µl/ямка в общо 3 ямки на нова 24-ямкова плака. Плаката се накланя внимателно на различни страни, за да се покрият равномерно дъната на ямките. Неизползваните ямки се запълват с по 1 ml стерилен фосфатен буфер.

12. Плаките се инкубират от 10 до 14 дни при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

13. С помощта на фазово-контрастен инвертен микроскоп се преброяват образувалите се колонии от типове BFU-E и CFU-GM във всяка ямка. За колония от тип BFU-E се приема струпване от над 200 еритробласти, в което се различават повече от 2 пространствено разделени подгрупи от клетки. За колония от тип CFU-GM се приема струпване от общо над 40 гранулоцити и макрофаги.

14. Резултатите се обработват статистически и се представят графично с помощта на програмата GraphPad Prism 5.0. Определят се стандартните отклонения и се прави анализ за значимостта на различията между отделните експериментални групи чрез непараметричния статистически тест на Mann-Whitney.

2.5. Оценяване на миграционната активност на миеломни клетки

Миграционната активност на миеломните клетки беше изследвана в опитна постановка, представляваща разновидност на камерата на Boyden (Boyden 1962). Принципът на метода се състои в отчитане на броя на клетките, преминали през мембранна преграда с диаметър на порите от порядъка на този на клетките, след като са били привлечени от наличието на хемоатрактант от другата й страна. Методът беше прилаган за изследване на влиянието на еруфозин върху миграционната активност на миеломните клетки, както и за сравняване на миграционната активност на миеломни клетки ОРМ-2 и техни производни, получени чрез генни модификации. Като хемоатрактант беше използван

FBS, а преди експериментите клетките бяха държани в безсерумна среда, за да се предизвика у тях глад за факторите, съдържащи се в серума. Измерването на относителния брой на мигриралите клетки беше осъществявано чрез оцветяването им със CellTiter Blue® (разтвор, съдържащ тъмносиньото багрило ресазурин, което в метаболитно активните клетки се превръща в розов резорурфин) и последващо флуорометрично отчитане на резултата. Методът има много нисък праг на чувствителност – около 200 клетки/ямка. Експериментите бяха провеждани съгласно следния протокол:

1. От всяка подлежаща на изследване клетъчна култура, след определяне на гъстотата ѝ, се взима обем, съдържащ $4 \cdot 10^6$ клетки и се прехвърля в центрофужна епруветка. Епруветките се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.

2. Надстоящата течност се изхвърля, а утайките от клетки се ресуспендират в по 4 ml безсерумна среда OPTI-MEM® I и се прехвърлят в отделни ямки на 24-ямкова плака, по 2 ml/ямка.

3. Плаката се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

4. (Важи в случаите, когато се изследва влиянието на Erufosine.) Деветнадесет часа по-късно, в едната от двете ямки за всеки вид клетки се добавя разтвор на еруфозин до постигане на желаната концентрация. Другите ямки остават за нетретирани контроли. Плаката се връща в инкубатора за още 5 часа.

5. На 24-ия час се взима нова стерилна 24-ямкова плака и в нея се разпределят по 600 µl среда OPTI-MEM® I на ямка. Броят на нужните ямки се определя като броят на пробите се умножи по 3 или 4 (защото от всяка проба се правят по 3 или 4 повторения на миграционния тест) и се добави още една, която да служи като празна проба. Същият брой ямки се запълват с по 600 µl среда OPTI-MEM® I, обогатена с FBS до 10% крайна концентрация.

6. Във всяка ямка (но не и в двете предназначени за празни проби) се поставя внимателно по един стерилен поликарбонатен филтър Millicell®-PCF с диаметър на порите 8 µm така, че долната му част с мембраната да е потопена изцяло в хранителната среда.

7. Плаката с клетките се изважда от инкубатора. От съдържанието на всяка ямка, чрез добавяне на OPTI-MEM® I, се приготвя разрежена клетъчна суспензия с гъстота $0,5 \cdot 10^6$ кл./ml (ако клетките са U-266 или OPM-2) или $0,25 \cdot 10^6$ кл./ml (ако клетките са RPMI-8226).

8. От всяка отделна разрежена клетъчна суспензия, приготвена в стъпка 7., се прехвърлят по 400 µl/филтър в пространството над мембраната на 3 или 4 филтъра, потопе-

ни в ямки със среда OPTI-MEM® I без FBS, както и в пространството над мембраната на 3 или 4 филтъра, потопени в ямки със среда OPTI-MEM® I, обогатена с FBS.

9. Плаката с така приготвената миграционна постановка се поставя в инкубатора.

10. Плаката се изважда от инкубатора след изтичане на 12 часа. Всички филтри се отстраняват внимателно, като се внимава да не се разлее течността от пространството над мембраната им. В тази течност са останали немигриралите клетки и тяхната преживяемост може да се определи по МТТ-метода на Mosmann (т. 2.3.).

11. В ямките предназначени за празни проби се добавят по около 100 µl OPTI-MEM® I (съотв. с или без FBS) до изравняване на нивото с това в другите ямки. (Част от течността в горния отсек на филтрите е преминала през мембраните в посока отгоре надолу и нивото на течността в ямките се е повишило.)

12. Във всички ямки се отпипетират по 140 µl CellTiter Blue®, след което плаката се връща в инкубатора за още 4 часа.

13. Плаката се изважда от инкубатора и се измерва флуоресценцията при 590 nm, при 560 nm дължина на вълната на възбуждащата светлина.

14. Резултатите се обработват статистически и се представят графично с помощта на програмата GraphPad Prism 5.0. От интензитета на флуоресценцията на всяка проба се изважда интензитета на флуоресценцията на съответната празна проба, в зависимост от това дали в пробата е имало FBS или не. След това се определя процентния дял на мигриралите клетки в експерименталните групи спрямо съответните контролни групи, което става чрез изчисляване на съотношението между съответните средни флуоресценции и умножаване по 100. Определят се стандартните отклонения на получените резултати и се прави анализ за значимостта на различията между отделните групи чрез непараметричния статистически тест на Mann-Whitney.

2.6. Оценяване на адхезионната способност на миеломни клетки

2.6.1. Адхезия към адсорбирани адхезионни молекули

Адхезионната способност на миеломните клетки беше оценявана по отношение на субстратите фибронектин и остеопонтин, адсорбирани към полистиренова повърхност. Измерването на относителния брой на адхезираните клетки беше осъществявано чрез оцветяването им с кристалвиолет и последващо спектрофотометрично отчитане. Пър-

воначално бяха определени оптималните условия за осъществяване на адхезия при различните клетъчни линии, след което установеният оптимален протокол беше използван при изучаване на влиянието на различни вещества върху адхезионната способност на клетките. Експериментите бяха провеждани съгласно следния протокол:

1. Приготвя се блокиращ разтвор по следната рецепта:

2,5 g говежди серумен албумин (BSA) се разтварят в 250 ml фосфатен буфер (по състав на Dulbессо, без съдържание на дивалентни катиони). Разтворът се филтрува през филтър с диаметър на порите 0,22 μm , за да се пречисти от неразтворени остатъци. Бутилката с филтрирания разтвор се поставя във водна баня при 85°C за 10-12 минути, до момента, в който разтворът започне да опалесцира – белег за образуване на албуминови агрегати. Ако разтворът се държи при 85°C по-дълго от необходимото, албуминовите агрегати стават прекалено големи, разтворът става мътнобял на цвят и не може да се използва. Разтворът трябва да се охлади до стайна температура преди употреба. Може да се съхранява в хладилник при 4°C.

Стъпки 2., 3., 4. и 5. важат в случаите, когато оптималните условия за осъществяване на адхезия вече са уточнени и се изследва влиянието на различни вещества.

2. След определяне на гъстотата на подлежащата на изследване клетъчна култура, от нея се взима обем, съдържащ $40 \cdot 10^6$ клетки и се прехвърля в центрофужна епруветка. Центрофугира се 5 минути при 1 500 об./мин.

3. Надстоящата течност се изхвърля, а утайката от клетки се ресуспендира в 20 ml хранителна среда. Получената клетъчна суспензия се разпределя в отделни ямки на 24-ямкова плака, по 2 ml/ямка.

4. Три от ямките се оставят за контроли и не се третират, а към останалите се прибавят съответните обеми разтвори на изследваните вещества до постигане на желаните концентрации.

5. Плаката се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.

6. При провеждане на оптимизация на условията се приготвя серия от разтвори на фибронектин с различна концентрация (1,25; 2,5; 5 и 10 $\mu\text{g/ml}$) чрез разреждане на изходния разтвор с фосфатен буфер. По същия начин се приготвят и серии от разтвори (5, 10 и 20 $\mu\text{g/ml}$) на рекомбинантен човешки остеопонтин и на остеопонтин, изолиран от майчино мляко. След като оптималните условия са вече ясни, при следващи експерименти се приготвят само разтворите със съответната оптимална концентрация.

7. При провеждане на оптимизация на условията, от всеки разреден разтвор, приготвен в стъпка 6., се отпипетират по 100 μl /ямка в 5 ямки на 96-ямкова плака. При изследване на влиянието на различни вещества, от разтворите с оптимална концентрация на фибронектин или остеопонтин се отпипетират по 100 μl /ямка, като броят на нужните ямки се определя по формулата $5 \times$ броя на експерименталните групи (включително нетретираната контрола). Това се прави час и половина преди изтичане на времето за инкубация на клетките с изследваните вещества. Плаката се оставя на стайна температура.

8. Един час по-късно, разтворите на адхезионните молекули се изтеглят внимателно от ямките и се заместват с по 200 μl блокиращ разтвор на ямка, като се пипетира внимателно, за да не се увреди образуващият се повърхностен слой от фибронектин или остеопонтин. Същото количество блокиращ разтвор се прибавя и в 5 нови ямки, неизползвани до момента. Плаката се оставя на стайна температура за 30 минути.

9. (Важи в случаите, когато се провежда оптимизация на условията.) Междувременно се определя гъстотата на подлежащата на изследване клетъчна култура, от нея се взема обем, съдържащ $40 \cdot 10^6$ клетки и се прехвърля в центрофужна епруветка. Центрофугира се 5 минути при 1 500 об./мин. Надстоящата течност се изхвърля, а утайката от клетки се ресуспендира в 20 ml хранителна среда. Епруветката с клетъчната суспензия се оставя в инкубатора за 15 минути, с леко развита капачка.

10. Блокиращият разтвор се изтегля внимателно от ямките и се замества с по 100 μl клетъчна суспензия на ямка, като или навсякъде се слага от тази, приготвена в стъпка 9. (в случаите, когато се провежда оптимизация на условията), или на група от 5 ямки с фибронектин и 5 с остеопонтин се слага материал от по една от ямките на плаката, приготвена в стъпка 4. (в случаите, когато се изследва влиянието на различни вещества). Във всеки случай, нетретирани клетки се слагат и в 5 нови ямки, неизползвани до момента. Освен това от изходните нетретирани клетки се приготвят две по-разредени клетъчни суспензии с гъстота съотв. 50% и 20% от изходната, чрез разреждане с фосфатен буфер, съотв. в съотношение 1:1 и 1:4. От всяка от тези разредени клетъчни суспензии също се отпипетират по 100 μl на ямка в по 5 нови ямки, неизползвани до момента. Във всички случаи се пипетира внимателно, за да не се увреди образуващият се повърхностен протеинов слой. Така приготвена, плаката се поставя в инкубатора.

11. След изтичане на определеното време за осъществяване на адхезия (30 или 60 минути) течността от всички ямки се изтегля внимателно и се изхвърля.

12. Всички ямки, с изключение на тези, които не са били обработени с блокиращ разтвор, се промиват много внимателно с по 100 μl фосфатен буфер три последовател-

ни пъти. Препоръчително е да се използват прерязани връхчета за пипети, за да не се отлепят клетките под действие на тънката бърза струйка.

13. Във всички ямки се отпипетират по 100 μ l 5%-ен разтвор (т/об) на глутаралдеhid. Фиксацията продължава 20 минути.

14. Глутаралдеhidът се изсмуква и всички ямки се промиват трикратно с по 100 μ l дестилирана вода.

15. Във всички ямки се отпипетират по 100 μ l 0,1%-ен разтвор на кристалвиолет. Оцветяването продължава 60 минути.

16. Оцветяващият разтвор се изсмуква и всички ямки се промиват трикратно с по 400 μ l дестилирана вода.

17. Във всички ямки се отпипетират по 100 μ l 10%-ен разтвор на оцетна киселина, след което плаката се разклаща върху подходяща клатачна машина в продължение на 2-3 минути, до пълно разтваряне на полепналото по фиксираните клетки багрило.

18. Измерва се абсорбцията при дължина на вълната 570 nm.

19. Получените опитни резултати се обработват чрез статистически методи с помощта на програмата GraphPad Prism 5.0. Отчетената средна стойност за абсорбцията в контролните ямки, чиято повърхност е била обработена само с блокиращ разтвор преди добавяне на клетките, се приема за отговаряща на 0% адхезия. Отчетените средни стойности за абсорбцията в трите групи от контролни ямки, чиято повърхност не е била обработена преди добавяне на клетките, се приемат за отговарящи съотв. на 20%, 50% и 100% адхезия, в зависимост от това дали добавените клетки са били с гъстота 20%, 50% или 100% от изходната. На базата на тези 4 точки се построява калибрационна права чрез линейна регресия и се изчисляват наклона и отреза на правата. Тези параметри се използват след това при изчисляване на средния процент на адхезия в отделните експериментални групи въз основа на известните средни абсорбции. Определят се стандартните отклонения на получените резултати.

2.6.2. Адхезия към монослой от остеобластни клетки SAOS-2

Адхезионната способност на миеломните клетки беше оценена и по отношение на монослой от остеобластни клетки SAOS-2. Измерването на относителния брой на адхериралите клетки беше осъществено чрез имуноблот, използвайки антитяло срещу анти-апоптотичния протеин Bcl-2, който се експресира от всички миеломни клетки, но не и от SAOS-2. Експериментът беше проведен съгласно следния протокол:

1. Култура от клетки SAOS-2 се трипсинира, както е описано в т. 2.1.3., стъпки от 1. до 6.
2. От клетъчната суспензия се взема обем, съдържащ $1,33 \cdot 10^6$ клетки, прехвърля се в центрофужна епруветка и се центрофугира 5 минути при 1 500 об./мин.
3. Надстоящата течност се изтегля, след което клетките се ресуспендират в 10 ml хранителна среда. Клетъчната суспензия се разпределя по 1,5 ml в 6 ямки на 12-ямкова плака, т.е. падат се по $0,2 \cdot 10^6$ клетки на ямка.
4. Плаката се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност на въздуха.
5. След като клетките образуват плътен монослой (след около 3-4 дни) се приготвят суспензии от различни видове миеломни клетки с гъстота $0,75 \cdot 10^6$ кл./ml в прясна хранителна среда.
6. Плаката с клетки SAOS-2 се изважда от инкубатора и се изтегля средата от всички ямки. В една от тях се добавят 2 ml прясна хранителна среда, а в останалите по 2 ml от различните приготвени суспензии от миеломни клетки. Плаката се връща в инкубатора.
7. Двадесет и четири часа по-късно се изтегля средата от всички ямки.
8. Всички ямки се промиват двукратно с по 1 ml фосфатен буфер, за да се отстранят клетките, които не са здраво прилепнали.
9. След изтегляне на втората порция фосфатен буфер, във всички ямки се добавя по 1 ml 0,25%-ен трипсинов разтвор.
10. Плаката се оставя в инкубатора и се наблюдава през няколко минути до отлепяне на клетките от дъното. Процесът може да се ускори чрез разклащане на плаката.
11. Добавя се равен обем хранителна среда, съдържаща FBS, за да се прекрати действието на трипсина.
12. Определя се гъстотата на клетките чрез хемоцитометър на Neubauer.
13. Съдържимото на всяка ямка се прехвърля в центрофужна епруветка и се центрофугира 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).
14. Следва се стандартната процедура за имуноблот, започвайки от стъпка 3. на т. 2.7.1.

2.7. Имуноблот (Western blot)

Отделните етапи на този метод за определяне на нивата на отделни протеини в клетки или в кондиционирана среда бяха провеждани съгласно следните протоколи:

2.7.1. Изолиране и замразяване на проби от клетки

1. Определя се гъстотата на клетките в отделните експериментални групи. От всяка проба се взима обем, съдържащ $2-4 \cdot 10^6$ клетки и се прехвърля в отделна центрофужна епруветка.

2. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).

3. Надстоящата течност се изсмуква, а клетъчните утайки се ресуспендират в по 1 ml фосфатен буфер и се прехвърлят в малки епруветки (1,5 ml).

4. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).

5. Надстоящата течност се изсмуква.

6. Епруветките с клетъчните утайки се затварят и се потапят в течен азот (-180°C) с цел бързо замразяване.

7. Замразените проби се съхраняват във фризер при -80°C до момента на употреба.

2.7.2. Лизиране и денатуриране на клетъчните проби

1. Приготвя се суспензионен буфер, както е описано в т. 4.1. на приложение I. Необходимото количество зависи от общия брой на клетките в пробите. За $n \cdot 10^6$ клетки са нужни $n \cdot 40 \mu\text{l}$ буфер.

2. Приготвя се лизиращ буфер, както е описано в т. 4.1. на приложение I. Необходимото количество зависи от общия брой на клетките в пробите. За $n \cdot 10^6$ клетки са нужни $n \cdot 40 - 10 \mu\text{l}$ буфер.

3. Отделно се приготвя лизиращ буфер без DTT. С този буфер се лизира малка част от всяка проба, като получените разтвори се използват за определяне на протеиновата концентрация на пробите (описано в т. 2.7.4.). Буферът се разпределя в 500-микролитрови епруветки по $10 \mu\text{l}$ на епруветка, като броят на епруветките трябва да е равен на

броя на пробите.

4. Трите буфера се поставят върху лед веднага след приготвянето им.
5. Всяка проба се ресуспендира в суспензионен буфер веднага след изваждането ѝ от фризера (-80°C). За $n.10^6$ клетки са нужни $n.40 \mu\text{l}$ буфер.
6. От всяка ресуспендирана проба веднага се взимат $10 \mu\text{l}$ и се прехвърлят в съответната ѝ 500-микролитрова епруветка с лизиращ буфер без DTT. Сместа веднага се хомогенизира и епруветката се поставя за 10 мин при 99°C .
7. Към останалите $n.40 - 10 \mu\text{l}$ от ресуспендираната проба веднага се добавят $n.40 - 10 \mu\text{l}$ лизиращ буфер с DTT, сместа се хомогенизира и епруветката се поставя за 10 минути на клатачна машина с термостат, предварително нагрята до 99°C .
8. След сваряване лизираните проби се охлаждат до 4°C и могат да се използват веднага или да се съхраняват в хладилник за по-късна употреба (но не по-дълго от 2 месеца).

2.7.3. Приготвяне и концентриране на проби от кондиционирана среда

1. Определя се гъстотата на клетките в отделните клетъчни култури. От всяка се взима обем, съдържащ $2,5.10^6$ кл. (миеломни клетки) или 1.10^6 кл. (SAOS-2) и се прехвърля в отделна центрофужна епруветка.
2. Епруветките се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.
3. Надстоящата течност се изсмуква, а клетъчните утайки се ресуспендират в по 5 ml стерилен фосфатен буфер.
4. Епруветките се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.
5. Надстоящата течност се изсмуква, а клетъчните утайки се ресуспендират в по 5 ml безсерумна среда OPTI-MEM® I. Клетъчните суспензии се прехвърлят в малки матраци.
6. Матраците се поставят в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност на въздуха. 24 и 48 часа по-късно се добавят по 5 ml OPTI-MEM® I във всички матраци. Култивирането продължава 72 часа.
7. Течната фаза от всеки матрак се прехвърля в отделна центрофужна епруветка. Епруветките се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.
8. Надстоящата течност от всяка епруветка се прекарва през филтър с диаметър на порите $0,4 \mu\text{m}$ и се прехвърля в нова епруветка. Може да се замрази при -80°C .

9. Кондиционираната среда от всяка епруветка се прехвърля в горния отсек на специална епруветка за концентриране на протеини (Amicon Ultra-15) с мембрана, задържаща протеини с молекулна маса над 10 000.

10. Концентриращите епруветки се центрофугират 20 минути при $3\ 857 \times g$ (5 000 об./мин с ротор 1617) и 4°C. Ако след това обемът на концентрата, останал в горния отсек, е по-голям от 1 ml, центрофугирането се продължава до постигане на обем в тези граници. Концентратите се прехвърлят в нови епруветки и могат да се съхраняват няколко дни при 4°C, но ако предстои да бъдат обработени с тромбин вместо това се провеждат следващите стъпки (от 11. до 14.). Това се налага, защото рН и минералният състав на кондиционираната среда не са подходящи за ензимното действие на тромбина.

11. Към концентратите в горния отсек на концентриращите епруветки се добавят по 14 ml буфер с оптимален състав за ензимното действие на тромбина (състав описан в т. 4.2. на приложение I).

12. Концентриращите епруветки се центрофугират 20 минути при $3\ 857 \times g$ (5 000 об./мин с ротор 1617) и 4°C. Ако след това обемът на концентрата, останал в горния отсек, е по-голям от 1 ml, центрофугирането се продължава до постигане на обем в тези граници.

13. Стъпки 11. и 12. се повтарят още веднъж.

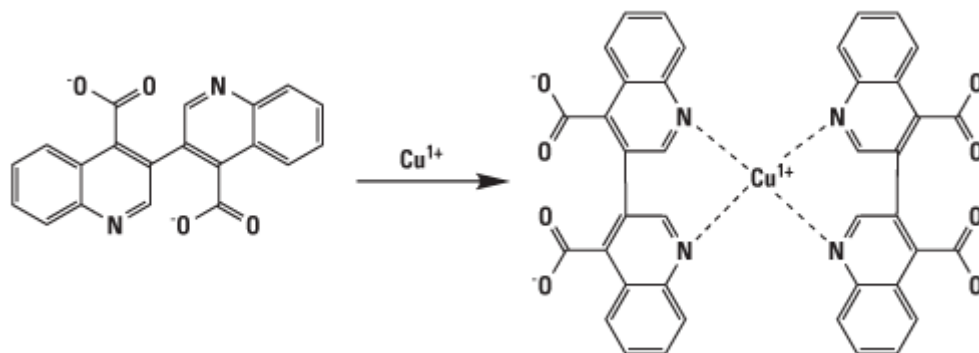
14. Концентратите се прехвърлят в нови епруветки и могат да се съхраняват няколко дни при 4°C.

2.7.4. Определяне на белтъчната концентрация на пробите

Необходимо е да се знае протеиновата концентрация на всички проби, за да може от всички да се нанесат върху гела обеми, съдържащи едно и също количество общ белтък. Това позволява бандовете на даден протеин в отделните проби да бъдат коректно сравнявани по интензитет.

➤ За измерване на протеиновата концентрация в лизираните клетъчни проби беше използван комплекта Pierce BCA Protein Assay Kit, базиран на метода на Smith (Smith, Krohn et al. 1985). Този метод комбинира известната биуретова реакция за доказване на протеини, при която медни (II) йони (Cu^{2+}) се редуцират в алкална среда до медни (I) йони (Cu^{1+}), с високочувствителен и селективен реагент за откриване на Cu^{1+} – бицинохонинова киселина (BCA). При взаимодействие на 2 молекули BCA с един меден (I)

йон се получава виолетово комплексно съединение, което е водоразтворимо и има абсорбционен максимум между 540 и 600 nm:



Точността на метода не се повлиява негативно от присъствието на детергенти като SDS в концентрация до 5%, но силно се влияе от редуциращи агенти като DTT.

1. Приготвя се работен разтвор от 50 обема реагент А и 1 обем реагент В (описани в т. 4.3 на приложение I). Необходимо е количество от 600 μ l на проба (трябва да се вземат предвид и пет стандартни проби).

2. Разтворът се разпределя по 200 μ l на ямка в 96-ямкова плака, така, че за всяка проба да има по 3 ямки с работен разтвор.

3. За построяване на калибрационна права се приготвят 5 стандартни разтвора на говежди серумен албумин (BSA) с концентрации 0, 500, 1000, 1500 и 2000 μ g/ml.

4. Пробите, лизирани с лизиращ буфер без DTT, се центрофугират 10 мин при 4°C и 8 600 \times g (10 000 об./мин с ротор FA-45-24-11).

5. Надстоящата течност от пробите се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:4.

6. От всяка разрежена проба се отпипетират по 10 μ l във всяка от трите ямки, предвидени за нея. Разбърква се добре.

7. От всеки стандартен разтвор се отпипетират по 10 μ l във всяка от трите ямки, предвидени за него. Разбърква се добре.

8. Плаката се инкубира 30 мин при 37°C.

9. Ако в ямките има мехурчета, те се отстраняват с помощта на връхче натопено в изоамилов алкохол, за да не попречат на точното измерване на абсорбцията.

10. Плаката се разклаща в продължение на 10 s.

11. Измерва се абсорбцията при дължина на вълната 570 nm и се изчислява средната \bar{y} стойност за всяка група от 3 ямки, съдържащи порции от една и съща проба.

12. С помощта на програмата Microsoft Excel се построява калибрационна права чрез линейна регресия и се изчисляват наклона и отреза на правата. Тези параметри се използват след това при изчисляване на протеиновата концентрация на пробите въз основа на средните им абсорбции.

➤ За измерване на протеиновата концентрация в концентрираните проби от кондиционирана среда беше използван реактива Roti®-Nanoquant, представляващ усъвършенстван реактив на Bradford с по-нисък праг на чувствителност. Съдържащото се в този разтвор багрило се свързва с протеините, при което се измества абсорбционният му максимум и цвета на разтвора се променя от червено-кафяв в син. Точността на метода не се повлиява негативно от присъствието на редуциращи агенти, включително DTT. Обаче дори и в ниски концентрации, детергентите предизвикват преципитиране на реактива.

1. За построяване на калибрационна права се приготвят стандартни разтвори на BSA с концентрации 0, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 75 и 100 µg/ml.

2. Пробите се разреждат с дестилирана вода в съотношение 1:19.

3. Стандартните разтвори и разредените проби се разпределят по 50 µl на ямка в 96-ямкова плака, като за всяка проба и за всеки стандартен разтвор се отделят по 3 ямки.

4. Приготвя се работен разтвор от 1 обемна част Roti®-Nanoquant и 4 обемни части дестилирана вода.

5. От работния разтвор се отпипетират по 200 µl във всяка ямка със стандартен разтвор или разредена проба. Изчаква се 5 минути.

6. Измерва се абсорбцията при дължини на вълната 450 и 595 nm.

7. Изчисляват се средните стойности на двете абсорбции за всяка група от 3 равнозначни ямки. За всяка група се пресмята съотношението A_{595}/A_{450} .

8. С помощта на програмата Microsoft Excel се построява калибрационна права чрез линейна регресия и се изчисляват наклона и отреза на правата. Тези параметри се използват след това при изчисляване на протеиновата концентрация на пробите въз основа на стойностите на съотношението им A_{595}/A_{450} .

2.7.5. Обработване и денатуриране на концентрираните проби от концентрирана среда и на стандартен остеопontiнов разтвор

Стъпки 1., 2. и 3. се отнасят само за пробите, подлежащи на изследване за съдържание на остеопонтин. Разцепването на остеопонтин от тромбин е много характерно и получаването на такива данни при имуноблота убедително доказва, че детектираният с анти тялото протеин е именно остеопонтин.

1. От всяка проба се взимат две равни порции, съдържащи по около 20 µg общ протеин и се прехвърлят в 500-микролитрови епруветки. В други две епруветки се приготвят по 100 µl разтвор на rhOPN с концентрация 60 µg/ml. Тези разтвори се приготвят чрез разреждане на изходния остеопontiнов разтвор с буфер с оптимален състав за ензимното действие на тромбина (състав описан в т. 4.2. на приложение I).

2. Към едната епруветка от всяка двойка се добавя 1 µl разтвор на тромбин с концентрация 0,13 U/µl, а към другата – 1 µl буфер с оптимален състав за ензимното действие на тромбина.

3. Епруветките се инкубират 2 часа при 30°C.

4. Към всяка епруветка се добавят разтвор на DTT (1 M) и буфер за нанасяне на проби NuPAGE® LDS 4X – на 100 µl проба се падат 36,1 µl разтвор на DTT и 45,1 µl NuPAGE® LDS 4X.

5. Епруветките се поставят за 10 мин при 99°C. След охлаждане могат да се използват веднага или да се съхраняват в хладилник за по-късна употреба.

2.7.6. Електрофореза в полиакриламиден гел при денатуриращи условия

1. Геловите се монтират в електрофорезната камера.

2. Горният и долният резервоари на електрофорезната камера се пълнят с 1× електрофорезен буфер. Ако търсеният протеин е с молекулна маса над 30-40 kDa се предпочита MOPS-съдържащият електрофорезен буфер. В противен случай се предпочита MES-съдържащият електрофорезен буфер.

3. Гребените се изваждат внимателно и джобовите на геловите се изплакват с електрофорезен буфер с помощта на спринцовка и подходящо за целта връхче.

4. От всяка лизирана и денатурирана клетъчна проба се взима количество, съдържа

жащо 30 µg общ белтък и се поставя в отделна епруветка. Към него се добавя три пъти по-малък обем буфер за нанасяне на пробите NuPAGE® LDS 4X. Така приготвените проби се пренасят без остатък в съответните джобове на гела, като се използва пипета с подходящо за целта връхче.

или

От всяка денатурирана проба от концентрирана кондиционирана среда се взима количество, съдържащо 3 µg общ белтък и се пренася без остатък в съответния джоб на гела, като се използва пипета с подходящо за целта връхче. От пробите с rhOPN се нанася количество, съдържащо 1 µg rhOPN.

5. В един джоб на всеки гел се нанасят 7,5 µl маркер за определяне на молекулната маса на протеините (т. 4.4. на приложение I).

6. Ако между отделните проби остане свободен джоб, той се натоварва с буфер за нанасяне на пробите, за да не се отклонят встрани протеините от съседните проби.

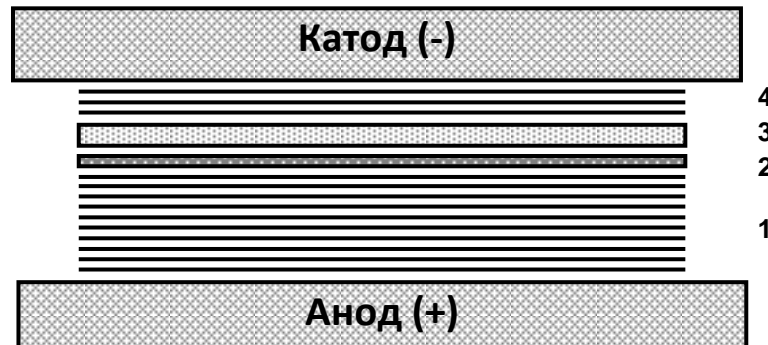
7. Поставя се капакът на камерата и тя се свързва с охлаждащата система (ако използваният тип камера е предназначен за работа с такава) и с трансформатора.

8. Разделянето на протеините се осъществява при 200V, за около 50 мин, ако се използва MOPS-съдържащият буфер, или за около 35 мин, ако се използва MES-съдържащият буфер.

2.7.7. Електротрансфер на протеините от гела върху PVDF-мембрана

1. След приключване на електрофорезата гелове се изваждат от камерата.
2. Пластмасовите рамки на гелове се отварят – за целта може да се използва скалпел или тънка шпатула, която се промушва в процепа между двете пластмасови плочки.
3. Частта от гелове покрай джобовете се изрязва внимателно със скалпел под права линия и се изхвърля.
4. Гелове се промиват 30 минути с трансферен буфер.
5. За всеки гел се изрязва PVDF-мембрана с размерите на гела (обичайно 8 на 6,5 cm).
6. Мембраните се активират 1-2 секунди в метанол, промиват се 2 минути в дестилирана вода и се накисват 15 минути в трансферен буфер.
7. За всеки гел се изрязват 13 парчета филтърна хартия Whatman с размерите на гела (обичайно 8 на 6,5 cm).
8. Филтърните хартии се напояват с трансферен буфер.

9. Филтърните хартии, мембраните и геловите се нареждат в хоризонтална блот-камера, както е показано на фиг. III.5. При подреждането се внимава да не останат въздушни мехури между слоевете, защото иначе се нарушава трансфера.



Фиг. III.5. Схема на постановката за електротрансфер. Легенда: 1 – 10 парчета филтърна хартия; 2 – PVDF-мембрана; 3 – гел; 4 – 3 парчета филтърна хартия.

10. Трансферът се провежда или за 1,5 часа при $0,8 \text{ mA/cm}^2$ и стайна температура, или за една нощ при $0,4 \text{ mA/cm}^2$ и 4°C .

2.7.8. Имунологична обработка на мембраните

1. Всяка мембрана се слага в отделен съд и се залива с 10-15 ml блокиращ разтвор. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 1 час при стайна температура.

2. Първичните антитела се разреждат с маркиращ разтвор. Степента на разреждане зависи от конкретното антитяло и е дадена в таблица III.1.

3. Всяка мембрана се залива с 6-10 ml разреден разтвор на избраното първично антитяло. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 2 часа при стайна температура или за една нощ при 4°C .

4. Мембраните се промиват последователно 4 пъти по 5 минути с миеш разтвор.

5. Съответните вторични антитела се разреждат с маркиращ разтвор – антимишето в съотношение 1:3 000, а антикозето и антизаешките в съотношение 1:5 000.

6. Всяка мембрана се залива с 6-10 ml разреден разтвор на съответното вторично антитяло. Мембраните се разклащат с разтвора в продължение на 45 мин при стайна температура.

7. Мембраните се промиват последователно 4 пъти по 5 минути с миеш разтвор.

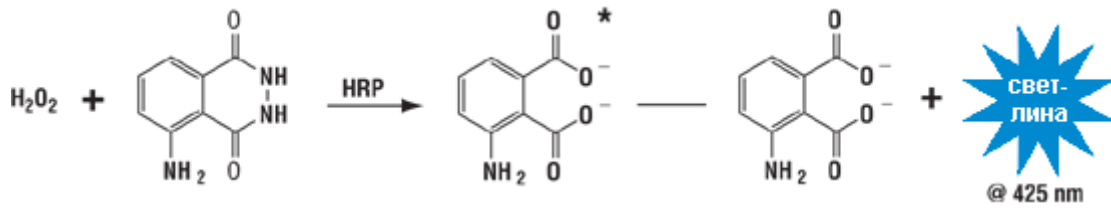
8. Мембраните за кратко се изплакват с дестилирана вода.

Табл. III.1. Разреждане на първичните антитела

Първично антитяло	Разреждане
AQP9 (sc-74409)	1:400
Mcl-1 (sc-12756) p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R (sc-7985-R) p-JNK (sc-6254)	1:600
FAS (sc-715) NF-κB p65 (sc-372) PARP-1 (sc-8007) p53 (sc-126) Rb (sc-102)	1:800
Akt1/2/3 (sc-8312) Bcl-X _L (sc-8392) Caspase-8 p18 (sc-6136) JNK (sc-7345)	1:1 000
Bcl-2 (sc-509) Caspase-3 (sc-56053) Caspase-9 p10 (sc-17784) Phospho-c-Raf (Ser338) (9427)	1:1 500
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (9664) Cleaved Caspase-9 (Asp330) (9501) PARP (9542) Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (9154) Phospho-MSK1 (Thr581) (9595) Phospho-p90RSK (Ser380) (9335) Phospho-Stat3 (Tyr705) (9145)	1:2 000
ERK1 (sc-94) ERK2 (sc-1647) p-ERK (sc-7383) LC3B (2775)	1:3 000
Actin (sc-1615) Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (4370)	1:4 000
Osteopontin (ab8448) Transferrin (sc-22597)	1:5 000

2.7.9. Визуализиране на комплексите антиген-антитяло

1. Веднага след последното изплакване, всяка мембрана се обработва 1 минута с 1,5 ml хемилуминесцентен реактив, приготвен непосредствено преди това (приготвянето му е описано в т. 4.8. на приложение I). Под действие на пероксидазата от хрян, конюгирана към вторичното антитяло, започва да протича следната реакция:



2. Мембраните се поставят за кратко с опаковата си страна върху попивателна хартия, за да се отстрани излишното количество хемилуминесцентен реактив.

3. Мембраните се опаковат в полипропиленово фолио и се поставят в рентгенови касети, като се закрепват стабилно с помощта на лепенки.

4. В тъмна стая, върху мембраните се поставя фотографски филм и касетите се затварят плътно.

5. Изчаква се известно време (от 2 секунди до 1 час в зависимост от видимия интензитет на луминесценцията), касетата се отваря и филмът се проявява. Ако се окаже, че филмът е преекспониран или недостатъчно експониран, се прави втора снимка, като времето на експозиция съответно се намалява или увеличава.

6. Филмите се сканират и се архивират в електронен вид. Интензитетите на отделните бандове и съответно относителните нива на протеините в пробите се определят денситометрично чрез програмата Quantity One. За всяка проба се изчисляват съотношенията между денситометрично определените интензитети на бандовете на търсените протеини и съответния интензитет за контролния протеин за групата от проби (най-често β -актин). В повечето случаи е практически тези съотношения в една от пробите (контролната) да се приемат за единици и останалите да се приравнят спрямо тях. Така се вижда колко пъти по-високи или по-ниски са нивата на търсените протеини в пробите в сравнение с контролата.

2.7.10. Отстраняване на антителата от мембраните (стрипиране)

Стрипиране на мембраните се прави, когато се иска мембрана, маркирана с антитяло срещу един протеин, да се използва за определяне на друг протеин със съответно друго антитяло.

1. Приготвя се стрипиращ разтвор, както е описано в т. 4.9. на приложение I. Разпределя се по 25 ml в 50-милилитрови епруветки, според броя на мембраните. Разтворът се загрява до $56^\circ C$.

2. Във всяка епруветка се поставя по една мембрана. Лицевата страна на мембраната

трябва да е обърната към вътрешността на епруветката, за да е в контакт с разтвора, а не със стената на епруветката.

3. Епруветките се разклащат с въртеливо движение около надлъжната им ос, при 56°C в продължение на 30 мин. За целта се използва клатачна машина със съответните характеристики.

4. Мембраните се промиват последователно 2 пъти по 5 минути с миещ разтвор. След това мембраните могат да се маркират с антитела по стандартната процедура, описана в т. 2.7.8., започвайки от стъпка 2.

2.8. Имунохистохимия

Сфероидите, получени при триизмерно клетъчно култивиране (т. 2.1.6.), бяха включени в парафинови блокчета. След нарязване с микротом, от тях бяха изготвени микроскопски препарати, които бяха подложени на имунохистохимично оцветяване с антитяло срещу антиапоптотичния протеин Bcl-2, експресиран от миеломните клетки, но не и от SAOS-2. Описаните процедури бяха извършени от екипа на доц. Маргарита Генова в НСБАЛХЗ (Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания).

2.9. Приготвяне на микроскопски препарати от конвенционални клетъчни култури

Микроскопски препарати от конвенционални суспензионни клетъчни култури бяха приготвяни в три случая – при изследване на морфологията на клетъчните ядра, при изследване на ганглиозид GM1-съдържащите мембранни липидни рафтове и при оценяване на трансфекционната ефективност. Препаратите бяха приготвяни съгласно следния протокол:

1. От всяка клетъчна култура се взема количество, съдържащо $0,2 \cdot 10^6$ клетки и се прехвърля в епруветка. Епруветките се допълват с фосфатен буфер до 1 ml, след което сместа се хомогенизира.

2. Получените клетъчни суспензии се разпределят по 200 μ l на гнездо в центрофуга за „цитоспин”. Така на всяко гнездо и съответно на всяко предметно стъкло се падат по $4 \cdot 10^4$ клетки.

3. Провежда се „цитоспин“ с продължителност 6 минути при $350 \times g$ (2 000 об./мин).
4. Предметните стъкла се изваждат от центрофугата, надписват се и се изчаква 10 минути, за да изсъхнат.
5. Налепите от клетки върху стъклата се фиксират с по 40 μ l 1%-ен разтвор на формалдехид във фосфатен буфер. Изчакват се 5-10 минути, за да изсъхнат.
6. Налепите се промиват три пъти с по 250 μ l фосфатен буфер и отново се изчаква да изсъхнат.
- 7а. (Важи при изследване на морфологията на клетъчните ядра и при оценяване на трансфекционната ефективност.) Върху налепите от клетки се накапват по 40 μ l разтвор на DAPI, след което предметните стъкла се оставят за 30 минути в кутия, непропускаща светлина.
- 7б. (Важи при изследване на ганглиозид GM1-съдържащите мембранни липидни рафтове.) Върху налепите от клетки се накапват по 40 μ l разтвор на CTxB-FITC, след което предметните стъкла се оставят за 60 минути в кутия, непропускаща светлина.
8. Налепите от клетки се промиват трикратно с по 250 μ l фосфатен буфер. Оставят се да изсъхнат, като през това време също се държат на тъмно.
9. Всички получени микроскопски препарати се съхраняват в хладилник в кутия, непропускаща светлина, за не повече от две седмици. В рамките на това време, но препоръчително по-рано, те се наблюдават под флуоресцентен микроскоп и се заснемат. Трансфектираните клетки и контролите им се наблюдават последователно през система от филтри за DAPI и такава за FITC, без да се променя зрителното поле. С първия филтър се виждат всички клетки (по-точно ядрата им), а с втория – само трансфектираните. Успоредно с наблюдението се правят снимки, като се използва една и съща експозиция при наблюдения през единия филтър и една и съща експозиция при наблюдения през другия филтър. Спазването на тези условия е необходимо, за да се гарантира съпоставимост между снимките и правилна преценка за съотношението между броя на успешно трансфектираните клетки и общия брой на клетките. Другите видове препарати също се заснемат при постоянни условия.

2.10. Поточна цитометрия

Беше използван поточно-цитометричният метод на Nicoletti като начин за определяне каква част клетки от общата популация имат съдържание на ДНК по-малко от ди-

плоидното (Nicoletti, Migliorati et al. 1991). Тази част от клетките е известна още като суб-G1-фракция. Нарастването ѝ е характерен белег при протичане на апоптоза. Беше работено по следния протокол:

1. Клетъчната суспензия, доведена до гъстота $0,3 \cdot 10^6$ кл./ml с прясна хранителна среда, се разпределя в 24-ямкова плака по 2 ml на ямка. За всяка проба се предвижда по една ямка.

2. Плаките се оставят за 24 часа в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност, за да може клетките да преодолеят стреса от прехвърлянето и отново да влязат в експоненциална фаза на растеж.

3. След изтичане на 24-те часа, клетките се третират с избрани вещества в избрани концентрации. Остава се и нетретирана контрола.

4. Плаката се връща в инкубатора.

5. След 24 часа от всяка ямка се взима по 1 ml клетъчна суспензия и се прехвърля в центрофужна епруветка (1,5 ml).

6. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).

7. Надстоящата течност се изсмуква, а утаените клетки от всяка проба се ресуспендират в 1 ml фосфатен буфер.

8. Ресуспендираните клетки се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).

9. Надстоящата течност се изсмуква, а утаените клетки от всяка проба се ресуспендират в 1 ml разтвор със следния състав: 50 $\mu\text{g/ml}$ пропидиев йодид, 0,1% Triton® X-100 и 0,1% натриев цитрат.

10. Пробите се инкубират 1 час на тъмно и при 4°C .

11. С поточен цитометър се анализират по 10 000 клетки от всяка проба, измервайки флуоресценцията им при 585 nm. Резултатите се представят графично с програмата WinMDI 2.9.

2.11. Електрофоретичен анализ на ДНК, изолирана от клетки

Този метод беше използван за установяване на евентуална олигонуклеозомна ДНК-фрагментация, която е характерен белег за протичане на апоптоза. ДНК беше изолирана от цитозола на контролни нетретирани или третирани с различни вещества миелом-

ни 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. Бяха спазвани следните протоколи:

2.11.1. Изолиране на цитозолна ДНК

1. В петрита се разпределят по $2-3 \cdot 10^6$ клетки в 5 ml среда. Петритата се оставят за 24 часа в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност, за да може клетките да преодолеят стреса от прехвърлянето и отново да влязат в експоненциална фаза на растеж.
2. Клетките се третират с избрани вещества в избрани концентрации. Оставя се и нетритирана контрола. Петритата се оставят за още 24 часа в инкубатора.
3. След изтичане на времето, всяка проба се прехвърля в 10-милилитрова епруветка.
4. Пробите се центрофугират 5 минути при $1\,500$ об./мин.
5. Надстоящата течност се изсмуква. Утаените клетки от всяка проба се ресуспендираат в 1 ml фосфатен буфер.
6. Пробите се прехвърлят в 1,5-милилитрови епруветки и се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ ($3\,000$ об./мин с ротор F-45-12-11).
7. Надстоящата течност се изхвърля. Утаените клетки от всяка проба се ресуспендираат в 750 μl лизиращ буфер (състав описан в т. 6.1. на приложение I).
8. Пробите се оставят за 10 минути върху лед.
9. Пробите се центрофугират 20 минути при $11\,230 \times g$ ($11\,000$ об./мин с ротор FA-45-24-11).
10. Надстоящата течност се прехвърля в нови 2-милилитрови епруветки. Към тях се прибавят по 187 μl 6 M NaCl и 937 μl изопропилов алкохол. Разбърква се добре.
11. Епруветките се оставят при -20°C .
12. На следващия ден (или по-късно) пробите се центрофугират 20 минути при $11\,230 \times g$ ($11\,000$ об./мин с ротор FA-45-24-11).
13. Надстоящата течност се изхвърля. Към утайките се прибавя по 1 ml студен 70%-ен етанол. Разбърква се добре.
14. Пробите се центрофугират 20 минути при $11\,230 \times g$ ($11\,000$ об./мин с ротор FA-45-24-11).
15. Етанолът се отлива, а епруветките се оставят отворени за 1–2 часа, за да се изсушат утайките.

16. Към изсушените утайки се прибавят по 30 μ l двойно дестилирана вода. Разбърква се добре.

17. Така обработените проби се оставят за едно денонощие при 4°C, за да се разтвори ДНК, след което се подлагат на електрофореза в агарозен гел, както е описано в т. 2.11.3.

2.11.2. Изолиране на ДНК от ядра на миеломни клетки, инкубирани с цитозол от третираните клетки SKW-3 (KE-37)

1. Следват се стъпки от 1. до 8. на т. 2.11.1., както за миеломните клетки, които се оставят нетретираните (5-6 проби), така и за левкемичните клетки SKW-3 (KE-37), които се третират с 20 μ M Erufosine (4-5 проби).

2. Пробите се центрофугират 10 минути при $9\,280 \times g$ (10 000 об./мин с ротор FA-45-24-11).

3. Надстоящата течност (цитозолната фракция) от третираните SKW-3 (KE-37) се събира и се запазва. Цитозолната фракция от нетретираните миеломни клетки се изхвърля, а утайките от ядрата им се ресуспендират в по 750 μ l буфер без Triton® X-100 (състав описан в т. 6.2. на приложение I).

4. Ресуспендираните ядра се центрофугират 10 минути при $9\,280 \times g$ (10 000 об./мин с ротор FA-45-24-11).

5. Надстоящата течност се изхвърля. Една от епруветките с утаени ядра от миеломни клетки се оставя върху лед. Към останалите се добавят по 750 μ l цитозолна фракция от третираните клетки SKW-3.

6. Епруветките се поставят на клатачна машина с термостат, предварително затоплена до 37°C.

7. Епруветките се изваждат една по една през определени интервали от време (напр. след 15, 30, 40, 60 и 90 минути инкубация) и веднага се центрофугират 10 минути при $9\,280 \times g$ (10 000 об./мин с ротор FA-45-24-11).

8. Надстоящата течност от всяка епруветка се изхвърля своевременно. Епруветките с утаени ядра се оставят върху лед, до обработване на последната.

9. Утайките от клетъчни ядра се ресуспендират в по 200 μ l фосфатен буфер.

10. Протеазата QIAGEN от комплекта QIAamp DNA Blood mini (50) се разтваря в 1,2 ml от предвидения разтворител. Прибавят се по 20 μ l от разтвора към всяка епруветка с

ресуспендирани ядра. Разбърква се добре.

11. Във всяка епруветка се прибавят по 200 µl буфер AL. Съдържанието на епруветките се размесва добре чрез пулсово „вортексиране” за 15 s.

12. Епруветките се инкубират 10 минути при 56°C.

13. Епруветките се центрофугират кратко, за да се събере цялата течност на дъното.

14. В епруветките се добавят по 200 µl етанол. Съдържанието на епруветките се размесва добре чрез пулсово „вортексиране” за 15 s. След това епруветките се центрофугират кратко, за да се събере цялата течност на дъното.

15. Съдържанието на всяка епруветка се пренася внимателно в отделна колонка QIAamp Mini Spin, предварително поставена в 2-милилитрова събирателна епруветка. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $6\,000 \times g$ (8 040 об./мин с ротор FA-45-24-11).

16. Колонките се прехвърлят в нови събирателни епруветки, а старите се изхвърлят заедно със събралата се в тях течност. Във всяка колонка се отпипетират внимателно по 500 µl буфер AW1 (приготвен чрез разреждане на концентрата с етанол), без да се намокря ръба ѝ. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $6\,000 \times g$ (8 040 об./мин с ротор FA-45-24-11).

17. Колонките се прехвърлят в нови събирателни епруветки, а старите се изхвърлят заедно със събралата се в тях течност. Във всяка колонка се отпипетират внимателно по 500 µl буфер AW2 (приготвен чрез разреждане на концентрата с етанол), без да се намокря ръба ѝ. Колонките се затварят и се центрофугират 3 минути при $20\,000 \times g$ (14 680 об./мин с ротор FA-45-24-11).

18. Колонките се прехвърлят в нови събирателни епруветки и се центрофугират 1 минута при $20\,000 \times g$ (14 680 об./мин с ротор FA-45-24-11).

19. Колонките се прехвърлят в 1,5-милилитрови епруветки. Във всяка колонка се отпипетират по 200 µl дестилирана вода. Изчаква се 1 минута. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $6\,000 \times g$ (8 040 об./мин с ротор FA-45-24-11).

20. Събралата се в епруветките течност представлява разтвор на ДНК. Може да се съхранява известно време в хладилник, преди да се подложи на електрофореза в агарозен гел.

2.11.3. Електрофореза на ДНК в агарозен гел

1. Приготвя се 0,8%-ен разтвор на агароза, като необходимото количество се определя в зависимост от желаните размери на гела. Агарозата се залива със съответното количество 1× TAE-буфер и се нагрива до кипене, при което се разтваря. Долива се дестилирана вода, за да се компенсира загубата на вода от изпарението.
2. След охлаждане до 45-50°C разтворът се излива в съответна по размери форма. Поставят се гребените. Гелът се оставя да се втвърди.
3. Гелът се поставя в електрофорезната камера, след което тя се запълва с 1× TAE-буфер. Махат се гребените.
4. От всяка проба, получена в т. 2.11.1. или 2.11.2., се взимат 20 µl и се смесват с 4 µl 6× оцветяващ разтвор. Всяка смес се нанася в съответен джоб на гела.
5. Смесват се 4 µl двойно дестилирана вода, 1 µl маркер ΦX174 DNA/BSuRI (HaeIII) и 1 µl 6× оцветяващ разтвор. Сместа се нанася в един от свободните джобове.
6. Електрофорезната камера се свързва към трансформатора. Необходимото напрежение (във волтове) се пресмята като дължината на гела (в сантиметри) се умножи по 10.
7. Електрофорезата се провежда при изчисленото напрежение за около 1 час и 30 мин.
8. Гелът се потапя внимателно в разтвор на етидиев бромид с концентрация 2 µg/ml и се държи в него 10 мин.
9. Гелът се премества във вана с вода и се държи в нея 10 минути.
10. Гелът се заснема чрез UV-транслюминатор с вградена камера.

2.12. Изолиране на клетъчни фракции, съдържащи мембрани липидни рафтове

В случая клетките бяха лизирани при сравнително меки условия, при които се разрушават клетъчните мембрани, но не и участъците от тях, известни като липидни рафтове. Получените лизати бяха подлагани на ултрацентрифугиране в захарозен градиент, при което лизатите се разделят на различни по плътност фракции. Така липидните рафтове изплуват в по-разредените слоеве на градиента, имащи сходна с тях плътност. След приключване на центрофугирането отделните слоеве бяха отделяни и анализира-

ни чрез имуноблот. Методът беше прилаган за изследване на влиянието на Erufosine върху присъствието на някои сигнални протеини в липидните рафтове. Беше работено по следния протокол:

1. Приготвят се няколко петрита с миеломни клетки в прясна хранителна среда (най-малко $2,5 \cdot 10^7$ клетки на проба).
2. Петритата се оставят за 24 часа в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност, за да може клетките да преодолеят стреса от прехвърлянето и отново да влязат в експоненциална фаза на растеж.
3. Клетките се третират с еруфозин в няколко различни концентрации. Оставят се и нетретирани контроли. Петритата се оставят за още 12 или 24 часа в инкубатора.
4. Преброяват се клетките във всяка проба с помощта на камера на Neubauer.
5. Съдържимото на всяко петри се прехвърля в отделна центрофужна епруветка.
6. Епруветките се центрофугират 5 минути при 1 500 об./мин.
7. Надстоящата течност се изтегля, а клетъчните утайки се ресуспендират в 1,8 ml фосфатен буфер всяка и се прехвърлят в други по-малки епруветки (2 ml).
8. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).
9. Надстоящата течност се изхвърля. Епруветките с клетъчните утайки могат да се съхраняват във фризер при -80°C , ако не се използват веднага.
10. Всяка проба от клетки се лизира в студен прясно приготвен лизиращ буфер (състав описан в т. 1.10.). За $3,5 \cdot 10^7$ клетки, колкото е средният брой на клетките в пробите, са необходими 1,1 ml лизиращ буфер. Лизирането се подпомага чрез хомогенизиране с хомогенизатор тип Potter-Elvehjem (5-6-кратно движение на буталото).
11. Хомогенизираните лизати се прехвърлят в предварително надписани 2-милилитрови епруветки и се оставят върху лед за 30 мин.
12. Епруветките се центрофугират 8 минути при 4°C и $80 \times g$ (1 000 об./мин).
13. В ултрацентрифужни епруветки се разпределят по 1 ml 85%-ен разтвор на захароза в TNEV-буфер.
14. Във всяка ултрацентрифужна епруветка се добавя по 1 ml надстояща течност от съответната лизирана и центрофугирана проба и сместа се разбърква добре.
15. Върху получената смес бавно и внимателно се наслояват последователно 6 ml 35 %-ен и 3,5 ml 5%-ен разтвор на захароза в TNEV-буфер.
16. Всички епруветки се претеглят на аналитична везна и се разпределят по двойки с еднакво или близко тегло. Ако е необходимо, към по-леките епруветки от всяка двойка

се прибавя необходимото количество 5%-ен разтвор на захароза в TNEV-буфер до уеднаквяване на теглото с епруветката-партньор (допустимо отклонение 10 mg).

17. Епруветките се поставят симетрично в ротора на ултрацентрифугата, като епруветките от всяка двойка се разполагат диаметрално една срещу друга.

18. Пробите се центрофугират 18 часа при 4°C и 35 000 об./мин (около $217\,000 \times g$).

19. След приключване на центрофугирането епруветките се изваждат внимателно от ротора.

20. Всяка проба се разделя последователно на 11 фракции, започвайки от повърхността на епруветката и стигайки до дъното ѝ – по 1 ml за всяка фракция. Всяка фракция се прехвърля в отделна надписана епруветка.

21. Отделените фракции се съхраняват при -80°C до момента на анализ чрез имуноблот. Спазва се стандартната процедура за имуноблот, започвайки от т. 2.7.6., като от всяка проба се нанася максимално количество (до запълване на съответния джоб на гела). За демонстриране на успешното изолиране на липидни рафтове, мембраните се маркират с разреден разтвор на СТxB-HRP в маркиращ разтвор (разреждане 1:500) за 2 часа, след което се продължава по стандартната процедура за имуноблот, започвайки от стъпка 7. на т. 2.7.8.

2.13. Изследване на вътреклетъчното натрупване на As_2O_3

Проникналият в клетките арсен след третиране с As_2O_3 беше определян количествено чрез атомно-абсорбционна спектрометрия (ААС). Методът беше използван за изучаване на влиянието на куркумина върху натрупването на As_2O_3 в миеломни клетки ОРМ-2. Бяха изследвани два варианта – предварително третиране с куркумин преди третирането с As_2O_3 и едновременно третиране с куркумин и As_2O_3 . Беше работено по следния протокол:

1. Приготвят се няколко петрита с миеломни клетки (по $3\text{-}4 \cdot 10^6$ клетки в 5 ml среда) и се разделят на три равни групи. Към едната група петрита се прибавя разтвор на куркумин до крайна концентрация 20 μM . Втората група петрита служат за нетретирани контроли. Третата група за момента също се оставя нетретирана.

2. Петритата се оставят в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 и максимална влажност.

3. Девет часа по-късно всички проби се прехвърлят в центрофужни епруветки. Центрофугират се 5 минути при $300 \times g$ (1 500 об./мин с ротор 220.97).

4. Надстоящата течност се изхвърля. Утайките от клетки се ресуспендират в по 2 ml физиологичен разтвор.
5. Епруветките се центрофугират 5 минути при $300 \times g$ (1 500 об./мин с ротор 220.97).
6. Надстоящата течност се изхвърля. Утайките от клетки се ресуспендират в по 5 ml прясна хранителна среда и се прехвърлят в нови петрита.
7. Към третата група проби се прибавя разтвор на куркумин до крайна концентрация 20 μM .
8. Към всички петрита се прибавя разтвор на As_2O_3 до крайна концентрация 5 μM .
9. Петритата се връщат в инкубатора.
10. През определени периоди от време (напр. 15, 30, 45, 60, 90 и 120 минути след прибавянето на As_2O_3) се взимат проби от трите групи. Пробите се прехвърлят в центрофужни епруветки.
11. Епруветките се центрофугират 5 минути при $300 \times g$ (1 500 об./мин с ротор 220.97).
12. Надстоящата течност се изхвърля. Утайките от клетки се ресуспендират в по 1 ml фосфатен буфер, към който е добавена EDTA до крайна концентрация 1 mM, след което се прехвърлят в 1,5-милилитрови епруветки.
13. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).
14. Надстоящата течност се изхвърля. Утайките от клетки се ресуспендират в по 1 ml фосфатен буфер.
15. Епруветките се центрофугират 5 минути при $600 \times g$ (3 000 об./мин с ротор F-45-12-11).
16. Надстоящата течност се изхвърля. Утайките от клетки се съхраняват при -80°C до момента на анализ чрез ААС.
17. Всяка проба се претегля заедно с епруветката, след което се лизира с 1 ml 25%-ен воден разтвор на тетраметиламониев хидроксид. Епруветките се претеглят отново и разликите в теглото се записват.
18. Така приготвените проби се предават на проф. Соня Ганева (Химически факултет на Софийски университет „Св. Климент Охридски“) за анализ чрез ААС.
19. От получените резултати в милиардни части арсен на единица тегло от пробата, и като се знае теглото на отделните проби, се изчислява цялото количество арсен във всяка проба. Като се знае броят на клетките във всяка проба, се намира и количеството

арсен, натрупало се в този брой клетки. Резултатите се представят графично спрямо времето, през което клетките са били в досег със средата, съдържаща As_2O_3 .

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

Отделните етапи на този метод за определяне на относителните нива на отделни иРНКи в клетките бяха провеждани съгласно следните протоколи:

2.14.1. Изолиране и замразяване на проби от клетки

Провежда се както при изолирането на проби за имуноблот, описано в т. 2.7.1., с тази разлика, че е достатъчно пробите да съдържат $1-2 \cdot 10^6$ клетки.

2.14.2. Изолиране на тотална РНК

1. Подготвя се за работа нужното количество буфер RLT, като към 100 обема буфер се добавя 1 обем 2-меркаптоетанол. Сместа има трайност 1 месец.

2. Буферът RPE е под форма на концентрат и трябва да се разреди преди употреба. За целта към 1 обем концентрат се добавят 4 обема етанол.

3. Епруветките с пробите се изваждат от фризера ($-80^{\circ}C$). Затоплят се и се разклащат с ръка, за да се отделят клетъчните утайки от стените и дъното, веднага след което във всяка епруетка се отпипетират по 350 μ l буфер RLT (с добавен 2-меркаптоетанол) и се разбърква.

4. Пробите се хомогенизират допълнително чрез поне 5-кратно прокаране през инжекционна игла с диаметър 0,9 mm (20G), с помощта на спринцовка, незамърсена с РНКазы. Алтернативно пробите могат да се „вортексират“ при максимална скорост в продължение на 1 минута.

5. Към хомогенизираните лизати се добавят по 350 μ l 70%-ен разтвор на етанол и се разбърква добре.

6. Така приготвените проби се прилагат върху колонки RNeasy, поставени в 2-милилитрови събирателни епруетки. Колонките се затварят и се центрофугират 20 s при $11\ 000 \times g$ (10 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

7. Събралата се в епруветките течност се изхвърля. Колонките отново се поставят в епруветките. В колонките се отпипетират по 700 μ l буфер RW1. Затварят се и се центрофугират 20 s при $11\,000 \times g$ (10 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

8. Събралата се в епруветките течност се изхвърля. Колонките отново се поставят в епруветките. В колонките се отпипетират по 500 μ l буфер RPE. Затварят се и се центрофугират 20 s при $11\,000 \times g$ (10 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

9. Събралата се в епруветките течност се изхвърля. Колонките отново се поставят в епруветките. В колонките се отпипетират още веднъж по 500 μ l буфер RPE. Затварят се и се центрофугират 2 минути при $11\,000 \times g$ (10 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

10. Събирателните епруветки се изхвърлят заедно със събралата се в тях течност. Колонките се поставят в нови 2-милилитрови събирателни епруветки и се центрофугират 1 минута при $16\,000 \times g$ (13 130 об./мин с ротор FA-45-24-11).

11. Колонките се поставят в нови 1,5-милилитрови събирателни епруветки, а старите се изхвърлят заедно със събралата се в тях течност. В колонките се отпипетират по 50 μ l вода, несъдържаща РНКази. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $11\,000 \times g$ (10 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

12. Събралата се в епруветките течност представлява разтвор на тотална РНК. Концентрацията ѝ се измерва спектрофотометрично при 260 nm. Чистотата ѝ се контролира по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 280 nm, както и по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 230 nm.

13. Разтворите на РНК се съхраняват при -20°C .

2.14.3. Пречистване на изолираната РНК от замърсяваща я ДНК

Този етап е необходим само в случаите, когато в клетките е имало наличие на сравнително къси фрагменти от ДНК (например плазмидна ДНК), които не се задържат достатъчно ефективно от мембраната на колонките RNeasy и които, попадайки в РНК-пробите, биха могли да послужат за субстрат на полимеразната верижна реакция и така да се отчете много по-високо ниво на дадена иРНК от действителното.

1. От всяка РНК-проба се взема количество, съдържащо около 2 μ g РНК и се прехвърля в отделна 0,2-милилитрова епруветка. Към всяка епруветка се добавя вода, несъдържаща РНКази, до краен обем 17 μ l.

2. Добавят се по 2 μ l концентриран реакционен буфер (10 \times) и 0,5 μ l дезоксирибонук-

леаза TURBO DNase. Разбърква се внимателно.

3. Епруветките се инкубират 30 минути при 37°C.
4. Към всяка епруветка се добавят по още 0,5 µl TURBO DNase.
5. Епруветките се инкубират още 30 минути при 37°C.
6. Реактивът за инактивиране на ДНКазата се разбърква до получаване на хомогенна суспензия, след което от него се отпипетират по 2 µl във всяка епруветка.
7. Епруветките се инкубират 5 минути при 22-26°C, като от време на време се разклащат.
8. Епруветките се центрофугират 1 минута и 30 секунди при $10\,000 \times g$ (10 780 об./мин с ротор FA-45-24-11).
9. Надстоящата течност, представляваща пречистен разтвор на РНК, се прехвърля в нови епруветки. Концентрацията на РНК се измерва спектрофотометрично при 260 nm. Чистотата ѝ се контролира по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 280 nm, както и по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 230 nm.
10. Разтворите на РНК се съхраняват при -20°C.

2.14.4. Обратна транскрипция на иРНК до кДНК

Стъпки 2., 3., 5., и 6. се извършват в UV-бокс за работа с нуклеинови киселини, след предварително облъчване на епруветките и пипетите в продължение на 30 минути.

1. Разтворите на тотална РНК, разтворът на олиго(дТ)₁₈-праймера, буферът RT, сместа от дезоксинуклеотидтрифосфати, рибонуклеазният инхибитор и водата, несъдържаща РНКази, се размразяват, разбъркват се, центрофугират се кратко и се държат върху лед в по-нататъшния ход на работата.

2. Рибонуклеазният инхибитор се разрежда с 1× буфер RT до крайна концентрация 10U/µl. „Вортексира” се не по-дълго от 5 s, центрофугира се кратко и се държи върху лед в по-нататъшния ход на работата.

3. От всеки разтвор на тотална РНК се взема количество, съдържащо 500 ng РНК и се прехвърля в отделна 200-микролитрова епруветка. Към всяка епруветка се добавя вода, несъдържаща РНКази, до общ обем 12 µl. Приготвя се и епруветка с водна контрола, съдържаща само 12 µl вода.

4. Епруветките с така приготвените проби се нагряват при 65°C в продължение на 5 минути, за да се денатурират РНКите със сложни вторични структури. Следва бързо охлаждане до 4°C.

5. Приготвя се т. нар. мастермикс, който има следния състав (за една проба):

- 10× буфер RT 2,0 µl
- Смес от дНТФ (5 mM за всеки дНТФ) 2,0 µl
- Олиго(дТ)₁₈-праймер (10 µM) 2,0 µl
- Рибонуклеазен инхибитор (10U/µl) 1,0 µl
- Обратна транскриптаза Omniscript 1,0 µl

Мастермиксът се приготвя в 10% по-голямо количество от пресметнатото според броя на пробите. „Вортексират“ се за не повече от 5 s, центрофугира се кратко и се държи върху лед.

6. Към всяка проба и към водната контрола се добавят по 8 µl мастермикс, след което се „вортексират“ за не повече от 5 s и се центрофугират кратко.

7. Пробите се инкубират 1 час при 37°C, след което се охлаждат до 4°C. Ако не се използват веднага, могат да се съхраняват при –20°C.

2.14.5. Полимеразна верижна реакция (PCR)

Стъпки 2., 3., 4. и 5. се извършват в UV-бокс за работа с нуклеинови киселини, след предварително облъчване на епруветките и пипетите в продължение на 30 минути.

1. Пробите, получени след обратната транскрипция, буферът за провеждане на реакцията, разтворът на MgCl₂, сместа от дезоксинуклеотидтрифосфати, разтворите на праймерите с концентрация 10 µM и водата, несъдържаща РНКазы, се размразяват, „вортексират“ се, центрофугират се кратко и се държат върху лед в по-нататъшния ход на работата.

2. В 200-микролитрови епруветки, отговарящи на броя на пробите, се разпределят по 11 µl вода, несъдържаща РНКазы.

3. От всяка проба се взима 1 µl и се прехвърля в отделна епруветка от тези, приготвени в стъпка 2. Внимава се цялото количество проба да попадне във водата. Приготвя се и епруветка с водна контрола, съдържаща само 12 µl вода. Разредените проби се държат върху лед.

4. Приготвя се т. нар. мастермикс, който има следния състав (за една проба):

• 10× PCR Buffer S	2,5 µl
• Разтвор на MgCl ₂ (25 mM)	2,0 µl
• Смес от дНТФ (10 mM за всеки дНТФ)	0,5 µl
• Разтвор на 5`-праймер (10 µM)	0,5 µl
• Разтвор на 3`-праймер (10 µM)	0,5 µl
• REDTaq-ДНК-полимераза	0,3 µl
• Вода, несъдържаща РНКази	6,7 µl

REDTaq-ДНК-полимеразата се изважда от фризера (-20°C) непосредствено преди включването ѝ в мастермикса и се връща обратно веднага след това. Мастермиксът се приготвя в 10% по-голямо количество от пресметнатото според броя на пробите. „Вортексират“ се за не повече от 5 s, центрофугира се кратко и се държи върху лед.

5. Към всяка епруветка с 12 µl разрежена проба, както и към водната контрола, се добавят по 13 µl мастермикс.

6. Всички епруветки се „вортексират“ за не повече от 5 s и се центрофугират кратко.

7. Епруветките с така приготвените проби веднага се поставят в термоциклер, който се пуска да работи по следната програма:

- начална денатурация – 3 минути при 94°C
 - денатурация – 40 секунди при 94°C
 - свързване – 1 минута при 58°C*
 - удължаване – 40 секунди при 72°C
 - крайно удължаване – 5 минути при 72°C
 - трайно поддържане на 4°C
- Повтаря се от 22 до 40 пъти, в зависимост от приблизителното ниво на търсената кДНК в пробите.§

* Свързването се провежда при 55°C при използване на чифта от праймери, който води до получаване на различни по дължина продукти за трите известни транскрипта на гена за остеоопонтин (OPN).

§ При сравняване на нивата на иРНК за синтез на:

- IL-6 в различни видове клетки – 40 повторения;
- OPN в различни видове клетки, при употреба на праймерите, които водят до получаване на един и същ продукт за трите известни транскрипта на гена – 34 повторения;
- OPN в различни видове клетки, при употреба на праймерите, които водят до

получаване на различни по дължина продукти за трите известни транскрипта на гена – 36 повторения;

- OPN в клетки OPM-2 и SAOS-2 с нивата в техни разновидности, получени след трансфекция с плазмиди, носещи гени за остеопонтин, при употреба на праймерите, които водят до получаване на различни по дължина продукти за трите известни транскрипта на гена – 35 повторения;

- Bcl-X_L в различни видове клетки – 28 повторения;

- Bcl-X_L в клетки U-266 с нивата в техни разновидности, получени след стабилна трансдукция с лентивирусни частици – 22 повторения;

- GAPDH в различни видове клетки – 22-25 повторения.

8. Епруветките с приключилите реакции могат да се съхраняват трайно при –20°C или за по-кратко време при +4°C до провеждане на електрофоретичен анализ на синтезираната ДНК.

2.14.6. Капилярна електрофореза на продуктите от RT-PCR

Стъпки от 1. до 4. важат само при първоначална подготовка за работа на нова касета за капилярна електрофореза.

1. Касета за капилярна електрофореза QIAxcel DNA Screening Cartridge се подготвя за работа, спазвайки следната процедура:

- Ваничката на поставката *Y* се пълни с 10 ml миещ буфер. Върху него се насляват 3 ml минерално масло.

- Касетата се изважда от опаковката и внимателно се отстраняват остатъците от гел по върховете на капилярките *Y*. Лепенката на гърба *Y* се отстранява.

- Касетата се закрепва на поставката така, че върховете на капилярките да са потопени в миещия буфер. Касетата се оставя в това положение за поне 20 мин.

2. Ваничката за буфери на апарата QIAxcel се подготвя за работа, спазвайки следната процедура:

- Ваничката се измива с топла вода, след което се изплаква с дейонизирана вода.

- Отделенията WP и WI се запълват с по 8 ml миещ буфер. Над буфера се насляват по 2 ml минерално масло.

- Отделението BUF се запълва с 18 ml разделителен буфер. Върху него се насляват 4 ml минерално масло.

- Ваничката се поставя в апарата.

3. Касетата се инсталира в апарата QIAxcel.

4. Провежда се калибриране на интензитета на сигналите от отделните капилярки. Спазва се следната процедура:

- Взима се лента от 12 слепени 200-микролитрови епруветки. Във всяка епруветка се отпипетират по 15 µl маркер за калибриране на интензитета.

- Лентата с епруветки се поставя в отделение MARKER2 на ваничката за буфери на апарата QIAxcel.

- Стартира се процедурата по калибриране чрез програмата BioCalculator от компютър, свързан с апарата.

5. Взима се лента от 12 слепени 200-микролитрови епруветки. Във всяка епруветка се отпипетират по 15 µl маркер за синхронизиране на сигналите QX Alignment Marker 15 bp/1 kb. След това във всяка епруветка се откапва по една капка минерално масло. Епруветките с маркер за синхронизиране могат да се използват многократно. Когато не се използват, се съхраняват при -20°C .

6. Лентата с епруветки, приготвена в стъпка 5., се центрофугира кратко, за да се отстранят евентуално образувалите се мехурчета и се поставя в отделение MARKER1 на ваничката за буфери на апарата QIAxcel.

7. Епруветките с проби, получени в края на PCR-етапа, се центрофугират кратко, за да се отстранят евентуално образувалите се мехурчета и се подреждат в гнездата на апарата в редици по 12. При първа употреба на нова касета, в едно от гнездата се поставя епруветка с 15 µl маркер QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII, разреден в съотношение 1:9 с $1\times$ буфер за провеждане на PCR. Ако общият брой на пробите не е кратен на 12 и следователно някой ред от гнезда е запълнен само частично, в свободните му гнезда се поставят епруветки пълни с по 15 µl разреждащ буфер, за да не остане някоя капилярка на сухо.

8. Чрез програмата BioCalculator от компютър свързан с апарата се задава използване на процедурен метод AL420, характеризиращ се със следните параметри: напрежение при инжектиране на пробата – 8 kV; време за инжектиране на пробата – 20 s; напрежение при електрофорезата – 5 kV; продължителност на електрофорезата – 420 s. Указва се местоположението на редиците с проби, попълват се данните за отделните проби и се стартира процедурата по електрофоретично разделяне на ДНК.

9. След приключване на електрофорезата получените данни за разделянето на ДНК-фрагментите от маркера QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII (ако е имало такъв сред пробите) се съхраняват и се задават като отправна точка за определяне на дължината на ДНК-молекулите в анализиранияте проби. Ако това е било направено при предишна електрофореза, съхранените данни се използват наготово.

10. Получените данни се съхраняват в електронен вид. За всяка изходна проба се изчисляват съотношенията между нормализираните площи на пиковете, отговарящи на амплифицираните ДНК-продукти на търсените иРНКи, и съответната нормализирана площ на пика, отговарящ на амплифицирания ДНК-продукт на иРНК за синтез на GAPDH (вътрешна контрола). Практично е тези съотношения в една от пробите (контролната) да се приемат за единици и останалите да се приравнят спрямо тях. Така се вижда колко пъти по-високи или по-ниски са нивата на търсените иРНКи в пробите в сравнение с контролата.

2.15. Размножаване на плазмиди

Плазмидите бяха размножени, за да се получат нужните количества за трансфекция на туморните клетки. За целта първо беше проведена трансформация на химиокомпетентни бактерии *Escherichia coli* с всеки един от трите необходими плаزمиди. Успешно трансформиранияте бактерии бяха размножени, при което автоматично беше умножен и броят на плазмидите. Накрая размножените плазмиди бяха изолирани от бактериите и пречистени. Отделните етапи бяха проведени съгласно следните протоколи:

2.15.1. Трансформация на химиокомпетентни *E.coli*

1. Три епруветки (по една за всеки плазмид) с химиокомпетентни *E. coli* се размразяват върху лед.

2. Във всяка епруветка се прибавят под форма на разтвор 10 ng от съответния плазмид. Обемът на разтвора трябва да е между 1 и 5 µl. Разбърква се внимателно, чрез леко разклащане на епруветката и в никакъв случай чрез пипетиране нагоре-надолу.

3. Епруветките се оставят за 5 минути върху лед.

4. Бактериите се подлагат на топлинен шок чрез потапяне на епруветките за 30 s във водна баня с температура 42°C.

5. Епруветките се оставят за 2 минути върху лед.
6. Бактериите от трите епруветки се посяват в отделни предварително затоплени до 37°C петрита със селективна среда – LB-агар, съдържащ 50-100 µg/ml ампицилин.
7. Петритата се поставят в инкубатор при 37°C.
8. На следващия ден вече могат да се наблюдават оформени колонии от успешно трансформирани *E. coli*. (Исходните бактерии нямат ген за бета-лактамаза и не биха могли да се размножат в ампицилин-съдържащата среда. Такъв ген са получили чрез плазмидите само успешно трансформираните клетки.)

2.15.2. Размножаване на успешно трансформираните *E. coli*

1. От всяко петри се взима една колония от успешно трансформирани бактерии и се прехвърля в отделна 500-милилитрова Ерленмайерова колба с 250 ml течна среда LB, съдържаща 50-100 µg/ml ампицилин.
2. Колбите се затварят хлабаво с алуминиево фолио и се поставят в инкубатор с клатачен механизъм при 37°C и 100 об./мин.
3. Колбите се изваждат от инкубатора, когато бактериите достигнат необходимата гъстота. Показател за това е стойност на абсорбцията при 600 nm между 2 и 4. Такава гъстота обикновено се постига за около 17-20 часа.
4. Колбите могат да се съхраняват 1-2 дни в хладилник при 4°C преди да се пристъпи към изолиране и пречистване на плазмидите.

2.15.3. Изолиране и пречистване на плазмидите

1. От всяка колба с размножени бактерии се взимат 150 ml и се разпределят в три 50-милилитрови центрофужни епруветки.
2. Епруветките се центрофугират 15 минути при $3\ 857 \times g$ (5 000 об./мин с ротор 1617).
3. Надстоящата течност се изхвърля. Във всяка епруветка се отпипетират по 4 ml разтвор за ресуспендиране на бактериални клетки. След получаване на хомогенни суспензии, съдържанието на трите епруветки от всяка група се смесва в една от епруветките.
4. Към всяка от трите епруветки се добавят по 12 ml разтвор за лизиране на бактери-

ални клетки. Съдържанието на епруветките се размесва чрез неколнократното им (3-5 пъти) плавно обръщане. След това епруветките се оставят в покой за 3 минути.

5. Към всяка от трите епруветки се добавят по 12 ml неутрализиращ разтвор. Съдържанието на епруветките се размесва цялостно чрез многократното им (10-15 пъти) плавно обръщане.

6. Съдържанието на всяка епруветка се прехвърля в 18 двумилилитрови епруветки.

7. Всяка група от двумилилитрови епруветки се центрофугира 20 минути при 14 000 × g (12 280 об./мин с ротор FA-45-24-11).

8. Надстоящата течност от епруветките от всяка отделна група се събира в отделна 50-милилитрова епруветка.

9. Към устройство за разпределяне на вакуума се включват 3 свързващи колонки PureYield™ Maxi Binding. Върху всяка от тях се поставя по една пречистваща колонка PureYield™ Clearing.

10. Около половината от всеки лизат, получен в стъпка 8., се излива в съответната му пречистваща колонка, след което се включва вакуумната помпа на максимална степен (650 mmHg).

11. След като течността премине последователно през двете колонки се прибавя втората половина от лизата.

12. След като течността премине напълно през колонките, вакуумът се намалява постепенно до пълно изключване. Пречистващите колонки се махат и се изхвърлят.

13. Във всяка колонка PureYield™ Maxi Binding се отпипетират по 5 ml разтвор за отмиване на ендотоксините, получен чрез разреждане на съответния концентрат с 24 ml изопропилов алкохол. Включва се вакуумната помпа.

14. След като течността премине напълно през колонките, във всяка се отпипетират по 20 ml разтвор за промиване на колонките, получен чрез разреждане на съответния концентрат със 137 ml 96%-ен етанол.

15. След като течността премине напълно през колонките се изчакват още 5 минути преди да се спре вакуума. Ако мембраните на колонките не изглеждат напълно сухи се прилагат още 5 минути вакуум.

16. Колонките се махат от устройството за разпределяне на вакуума. Долните им краища се забърсват с хартия, за да се премахнат евентуални остатъци от етанол. 17. Колонките се поставят вътре в 50-милилитрови епруветки. Върху мембраната на всяка колонка се отпипетират по 1,5 ml вода, несъдържаща нуклеази.

18. Епруветките с колонките се центрофугират отворени в продължение на 5 минути при $2\ 000 \times g$ (3 600 об./мин с ротор 1617).

19. Събралият се на дъното на епруветките пречистен разтвор на плазмидна ДНК се прехвърля в 1,5-милилитрови епруветки. Концентрацията на ДНК се измерва спектрофотометрично при 260 nm. Чистотата ѝ се контролира по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 280 nm, както и по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 230 nm.

20. Разтворите на плазмидите се съхраняват при -20°C .

2.16. Линеаризиране на плазмиди

Плазмидите бяха линеаризирани чрез ензимна рестрикция. Беше използвана рестрикционната ендонуклеаза (рестриктаза) PvuI, която може да „среже“ всеки един от трите използвани плаزمиди в един-единствен специфичен участък. Този участък е идентичен в трите плазмиди и се намира 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. Отделните етапи бяха проведени съгласно следните протоколи:

2.16.1. Провеждане на рестрикцията

1. От разтвора на всеки плазмид се взима обем, съдържащ 5 μg ДНК и се прехвърля в отделна 500-микролитрова епруветка. Във всяка епруветка се добавя вода, несъдържаща нуклеази, до краен обем 43 μl .

2. Във всяка епруветка се добавят по 5 μl реакционен буфер R и 2 μl рестриктаза PvuI (10 U/ μl). Сместа се разбърква внимателно, след което епруветките се центрофугират кратко.

3. Епруветките се инкубират 4 часа при 37°C . След това могат да се съхраняват при -20°C до пречистване на плазмидите от ензима и другите компоненти.

2.16.2. Пречистване на линеаризираните плазмиди

1. След прекратяване на рестрикцията, към всяка реакционна смес се добавя 5 пъти по-голям обем буфер РВ. Препоръчително е към буфера предварително да се добави рН-индикатор от предоставения в комплекта – 1 обем рН-индикатор на 250 обема буфер. Цветът на общата смес трябва да е жълт. Ако рН е твърде високо (над 7,5) цветът става оранжев или виолетов.

2. Така приготвените смеси се прилагат върху колонки QIAquick Spin, поставени в 2-милилитрови събирателни епруветки. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $17\,900 \times g$ (13 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

3. Събралата се в епруветките течност се изхвърля. Колонките отново се поставят в епруветките. В колонките се отпипетират по 750 μ l буфер РЕ, получен след разреждане на концентрата с етанол. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $17\,900 \times g$ (13 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

4. Събралата се в епруветките течност се изхвърля. Колонките отново се поставят в епруветките и се центрофугират още 1 минута при $17\,900 \times g$ (13 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

5. Колонките се поставят в нови 1,5-милилитрови събирателни епруветки, а старите се изхвърлят заедно със събралата се в тях течност. В колонките се отпипетират по 50 μ l буфер ЕВ върху центъра на мембраната. Колонките се затварят и се центрофугират 1 минута при $17\,900 \times g$ (13 890 об./мин с ротор FA-45-24-11).

6. Събралата се в епруветките течност представлява пречистен разтвор на плазмидна ДНК. Концентрацията ѝ се измерва спектрофотометрично при 260 nm. Чистотата ѝ се контролира по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 280 nm, както и по стойността на съотношението на абсорбциите при 260 и 230 nm.

7. Разтворите на линеаризираните плазмиди се съхраняват при -20°C .

2.16.3. Електрофоретичен анализ на линеаризираните плазмиди

1. Следва се процедурата, описана в т. 2.11.3., стъпки от 1. до 3., с разликата, че вместо $1 \times$ ТАЕ-буфер се използва $0,5 \times$ ТВЕ-буфер.

2. От всеки разтвор на пречистен линеаризиран плазмид се взимат 10 μ l (около 1 μ g ДНК) и се смесват с 2 μ l $6 \times$ оцветяващ разтвор. По същия начин се процедира и с контролните разтвори на изходните затворени (кръгови) плазмиди – от всеки се взима коли-

чество съдържащо 1 µg ДНК, което след това се разрежда с вода до обем 10 µl и се смесва с 2 µl 6× оцветяващ разтвор. Всяка смес се нанася в съответен джоб на гела.

3. Смесват се 4 µl двойно дестилирана вода, 1 µl маркер GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder и 1 µl 6× оцветяващ разтвор. Сместа се нанася в един от свободните джобове.

4. Електрофорезната камера се свързва към трансформатора. Необходимото напрежение във волтове се пресмята като дължината на гела в сантиметри се умножи по 5.

5. Електрофорезата се провежда при изчисленото напрежение за около 1,5-2 часа.

6. Следва се процедурата, описана в т. 2.11.3., стъпки от 8. до 10.

2.17. Въвеждане на чужд генетичен материал в еукариотни клетки

Бяха използвани два различни способа за въвеждане на чужд генетичен материал в туморните клетки – трансфекция и трансдукция. Гените за остеопонтин бяха въведени с посредничеството на плазмиден вектор. Трансфекцията на туморните клетки с плазмиди (затворени или линейни) беше осъществявана с помощта на химични агенти, подпомагащи процеса. Оптимизацията на процеса и контролът върху ефективността му бяха осъществявани чрез трансфектиране на прицелните клетки с контролен флуоресциращ олигонуклеотид. Бяха сравнени качествата на два различни трансфектиращи реагента, единият представляващ катионен полимер (TurboFect™), а другият смес от катионни липиди, образуващи липозоми (Lipofectamine™ 2000). Генът за интерферираща РНК, насочена срещу иРНК за човешки Vcl-X_L, както и съответните контролни гени (за зелено-флуоресциращия протеин сорGFP и за РНК-секвенция, която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК), бяха въведени в клетките с посредничеството на лентивируси. Наличието в плазмидите и вирусните частици на гени, обуславящи резистентност към различни антибиотици, позволи да се проведе селекция на клетки, характеризиращи се с трайно интегриране и експресия на чуждия генетичен материал в техния геном.

Отделните процедури бяха провеждани съблюдавайки следните протоколи:

2.17.1. Трансфекция с помощта на Lipofectamine™ 2000

Посочените по-долу количества важат при използване на 24-ямкови плаки. При провеждане на трансфекция в 12-ямкови плаки се взимат двойно по-големи количества.

1. Приготвя се клетъчна суспензия с гъстота $1,6 \cdot 10^6$ кл./ml (за миеломни клетки) или $0,4 \cdot 10^6$ клетки/ml (за клетки SAOS-2). Получената суспензия се разпределя по 500 μ l на ямка, в толкова ямки, колкото са необходими за целите на конкретния експеримент.

2. Плаката се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност, за времето докато се приготви разтворът за трансфекция (при трансфекция на миеломни клетки) или за 24 часа (при трансфекция на клетки SAOS-2).

3. Изчислява се необходимото количество от флуоресциращия олигонуклеотид съобразно броя на ямките, които трябва да бъдат трансфектирани с него. Крайната му концентрация трябва да е 100 nM, което означава, че са необходими 60 pmol на ямка – количество, което се съдържа в 3 μ l от изходния разтвор на олигонуклеотида. Необходимото количество плазмидна ДНК се изчислява по сходен начин, като се предвиждат по 0,8 μ g на ямка.

4. Изчислява се необходимото количество Lipofectamine™ 2000, като се предвиждат по 2 μ l за ямка. Когато се провежда трансфекция с цел след това да се изследва преживяемостта на клетките, трансфектирани с даден плазмид, се предвиждат и контроли, третирани само с Lipofectamine™ 2000. Пресметнатото количество винаги се завишава с 5%, за да има резерв.

5. Изчислените обеми от всеки разтвор на плазмид или олигонуклеотид се отпипетират в отделни епруветки. Всяка епруетка се допълва със среда OPTI-MEM® I до обем, който се изчислява по формулата $50 \mu\text{l} \times \text{брой на ямките}$, в които ще се проведе трансфекция със съответния олигонуклеотид или плазмид. Сместа се разбърква чрез бавно и внимателно пипетиране нагоре-надолу.

6. Изчисленото количество Lipofectamine™ 2000 се отпипетира в епруетка. Разрежда се с 24 пъти по-голям обем среда OPTI-MEM® I. Пипетира се бавно и внимателно.

7. Изчакват се 5 минути.

8. Във всяка епруетка, съдържаща разтвор на олигонуклеотид или плазмид, се отпипетира еквивалентен обем от получения разтвор на Lipofectamine™ 2000. Сместа се разбърква чрез бавно и внимателно пипетиране нагоре-надолу.

9. Изчакват се 20 минути, за да се образуват липоплекси (комплекси от липозоми и нуклеинови киселини).

10. Във всяка ямка с клетки, предопределени за трансфектиране, се отпипетират по 100 μ l от съответния липоплексен разтвор.

11. В контролните ямки се отпипетират по 100 μ l среда OPTI-MEM® I. Когато се провежда трансфекция с цел след това да се изследва преживяемостта на клетките, в ямките, служещи за контрола на собствената токсичност на трансфектиращия реагент, се отпипетират по 50 μ l от разреждения Lipofectamine™ 2000 и 50 μ l среда OPTI-MEM® I.

12. Плаката се разклаща внимателно в хоризонтално направление и се връща в инкубатора.

13. След 6 до 24 часа, от клетките, трансфектирани с флуоресциращ олигонуклеотид, се приготвят микроскопски препарати за оценка на трансфекционната ефективност, както е описано в т. 2.9. Към останалите клетки се добавя прясна хранителна среда, за да се поддържат в експоненциална фаза на растеж.

14. При задоволително ниво на трансфекция, от клетките могат периодично (напр. на 24-ия, 48-ия и 72-ия час от трансфекцията) да се взимат проби за имуноблот, RT-PCR или оценяване на преживяемостта, така както е описано в съответните протоколи.

2.17.2. Трансфекция с помощта на TurboFect™

1. Приготвя се суспензия от миеломни клетки с гъстота $0,5 \cdot 10^6$ кл./ml и се разпределя в стерилна 24-ямкова плака по 1 ml на ямка.

2. Плаката се оставя за 24 часа в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност.

3. Изчислява се необходимото количество от флуоресциращия олигонуклеотид съобразно броя на ямките, които трябва да бъдат трансфектирани с него. Крайната му концентрация трябва да е 100 nM, което означава, че са необходими 110 pmol на ямка – количество, което се съдържа в 5,5 μ l от изходния разтвор на олигонуклеотида.

4. Изчисленият обем от разтвора на флуоресциращия олигонуклеотид се отпипетира в епруветка. Допълва се със среда OPTI-MEM® I до обем, който се изчислява по формулата $100 \mu\text{l} \times \text{брой на ямките}$, подлежащи на трансфекция. Сместа се разбърква чрез бавно и внимателно пипетиране нагоре-надолу.

5. Флаконът с TurboFect™ се „вортексира“ кратко. Към разтвора на олигонуклеотида се добавя 50 пъти по-малък обем TurboFect™. Разбърква се незабавно чрез пипетиране или „вортексиране“.

6. Изчакват се 15-20 минути, за да се образуват полиплекси (комплекси от полимери и нуклеинови киселини).
7. Във всяка ямка с клетки, предопределени за трансфектиране, се откапват по 100 μ l от получения разтвор.
8. В контролните ямки се отпипетират по 100 μ l среда OPTI-MEM® I.
9. Плаката се разклаща внимателно в хоризонтално направление и се връща в инкубатора.
10. След 6 до 24 часа, от клетките, трансфектирани с флуоресциращ олигонуклеотид, се приготвят микроскопски препарати за оценка на трансфекционната ефективност, както е описано в т. 2.9.

2.17.3. Селекция на стабилно трансфектирани клетки

1. На 48-ия час след трансфекцията, към клетките, трансфектирани с линеаризирани плазмиди, се добавя разтвор на G418-дисулфат до крайна концентрация 750 μ g/ml (определена като цитотоксична при предварителни експерименти).
2. Клетките се поддържат в експоненциална фаза на растеж чрез периодично добавяне на прясна хранителна среда. При достигане на достатъчен брой, клетките се превърлят в малки матрици. При всяко добавяне на нова среда се добавя и G418-дисулфат, за да се поддържа постоянна концентрацията от 750 μ g/ml. Културите се поддържат възможно по-гъсти, за да се преодолее по-лесно критичният момент, когато се прояви цитотоксичния ефект на G418 (той е отложен във времето и се проявява едва след 3-4 дни).
3. След проява на първите признаци на цитотоксичност се прекратява добавянето на нова среда към клетките. В рамките на 2-3 дни всички клетки, които не са получили ген за аминокликозид-фосфотрансфераза, загиват. Минават още 1-2 седмици преди да започне пролиферацията на оцелелите стабилно трансфектирани клетки.
4. Клетките се поддържат в експоненциална фаза на растеж чрез добавяне на прясна хранителна среда. Концентрацията на G418 се поддържа няколко седмици. Експресията на гените за остеопонтин се проверява периодично чрез RT-PCR.
5. Премахва се към култивиране на клетките без добавяне на G418. Извършва се криоконсервиране на 15-20 епруветки с клетки, по методиката описана в т. 2.1.4.

2.17.4. Трансдукция и последваща селекция на клетки, трайно експресиращи трансдуцираните гени

Стъпки от 7. до 9. се извършват задължително в ламинарен бокс с второ ниво на биологична безопасност.

1. От клетъчната култура, след определяне на гъстотата \dot{Y} , се взима обем, съдържащ $4,5 \cdot 10^5$ клетки и се прехвърля в центрофужна епруветка. Центрофугира се 5 минути при 1 500 об./мин.

2. Междувременно се приготвят 10 ml специална хранителна среда, представляваща смес от прясна среда и кондиционирана среда (получена според протокола в т. 2.7.3., стъпки от 1. до 8.) от подлежащата на трансдукция клетъчна линия, и имаща 1,2 пъти по-големи концентрации на FBS и L-gln от обичайните. За целта към 4,89 ml стандартна прясна хранителна среда, съдържаща 10% FBS и 2 mM L-gln, се прибавят 4,89 ml кондиционирана среда, 200 μ l FBS и 20 μ l 200 mM L-gln.

3. Към 2,5 ml от така приготвената хранителна среда се прибавят 1,25 μ l разтвор на Polybrene® с концентрация 10 mg/ml. Разбърква се.

4. Надстоящата течност от епруветката с центрофугираните клетки се изтегля и изхвърля. Клетките се ресуспендират в 2,25 ml от специалната хранителна среда с добавен Polybrene®.

5. Клетъчната суспензия се разпределя в 8 ямки на 24-ямкова плака, по 250 μ l на ямка.

6. Размразяват се концентратите на трите вида лентивирусни частици, носещи съответно ген за зелено-флуоресциращия протеин copGFP, ген за контролна РНК-секвенция, която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК и ген за интерферираща РНК, насочена срещу иРНК за човешки Vcl-X_L.

7. От всеки концентрат, след разбъркване, се прехвърлят по 50 μ l на ямка (около 50 000 вириона на ямка) в две от осемте ямки. Плаката се разклаща внимателно в хоризонтално направление и се поставя в инкубатор при 37°C, 5% CO₂ и максимална влажност.

8. Двадесет и четири часа по-късно съдържанието на всяка ямка се прехвърля в отделна 1,5-милилитрова центрофужна епруветка. Епруветките се центрофугират 5 минути при 200 × g (1 500 об./мин с ротор FA-45-24-11).

9. Надстоящата течност се изхвърля при спазване на изискванията за биологична безопасност. Всяка клетъчна утайка се ресуспендира в 300 μ l от специалната хранител-

на среда (без Polybrene®), след което всяка от получените клетъчни суспензии се връща в съответната изходна ямка, от която са взети клетките.

10. Плаката се връща в инкубатора за 48 часа.

11. Към всяка ямка се добавят по още 300 µl от специалната хранителна среда. Добавя се разтвор на пурамицин дихидрохлорид до крайна концентрация 6 µg/ml (определена като цитотоксична при предварителни експерименти).

12. В рамките на 2-3 дни всички нетрансдуцирани клетки загиват. Минават още 1-2 седмици преди да започне пролиферацията на оцелелите стабилно трансдуцирани клетки.

13. Клетките се поддържат в експоненциална фаза на растеж чрез периодично добавяне на прясна хранителна среда. При всяко добавяне на нова среда се добавя и пурамицин дихидрохлорид, за да се поддържа постоянна концентрацията му от 6 µg/ml. Експресията на трансдуцираните гени се следи чрез флуоресцентна микроскопия (за клетките, трансдуцирани с лентивирусни частици, носещи ген за сорGFP), както и чрез RT-PCR или имуноблот за Vcl-X_L (за клетките, трансдуцирани с лентивирусни частици, носещи ген за интерферираща РНК, насочена срещу иРНК за човешки Vcl-X_L).

14. След няколко седмици се преминава към култивиране на клетките без добавяне на пурамицин. Извършва се криоконсервиране на 15-20 епруветки с клетки, по методиката описана в т. 2.1.4.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Клетъчни ефекти на изследваните вещества и комбинации от вещества

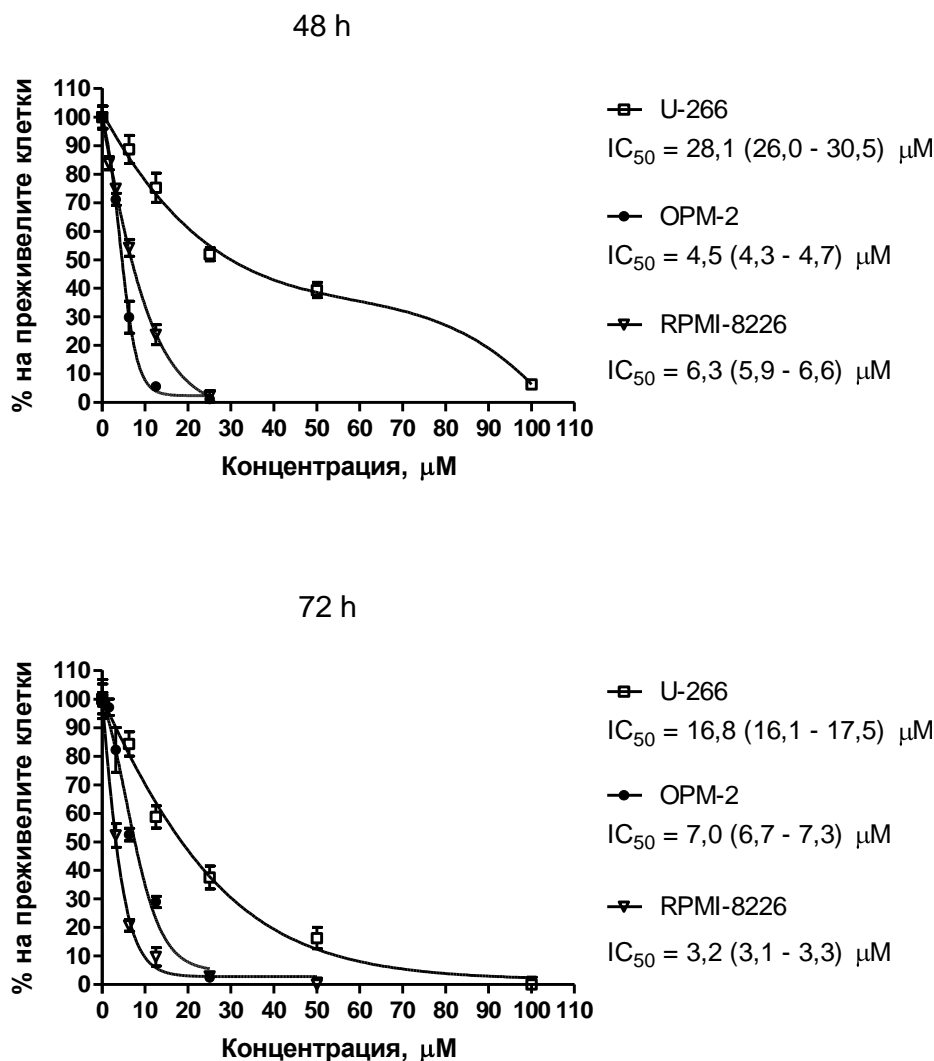
1.1. Цитотоксични ефекти

1.1.1. Самостоятелни цитотоксични ефекти на отделните вещества

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

Беше изследван ефектът на еруфозина върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 1,56 и 100 μM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.1. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. OPM-2 и RPMI-8226 се открояват като по-чувствителни в сравнение с U-266. IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия OPM-2 е 4,5 (95%-доверителен интервал: 4,3 - 4,7) μM при 48-часово въздействие и 7,0 (6,7 - 7,3) μM при 72-часово въздействие. Съответните IC_{50} -стойности при RPMI-8226 са 6,3 (5,9 - 6,6) μM при 48-часово въздействие и 3,2 (3,1 - 3,3) μM при 72-часово въздействие. Концентрации от порядъка на 25 μM постигат почти пълно унищожаване на тези два вида миеломни клетки. IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия U-266 е 28,1 (26,0 - 30,5) μM при 48-часово въздействие и 16,8 (16,1 - 17,5) μM при 72-часово въздействие, а концентрацията необходима за пълно унищожаване на тези клетки е около 100 μM .

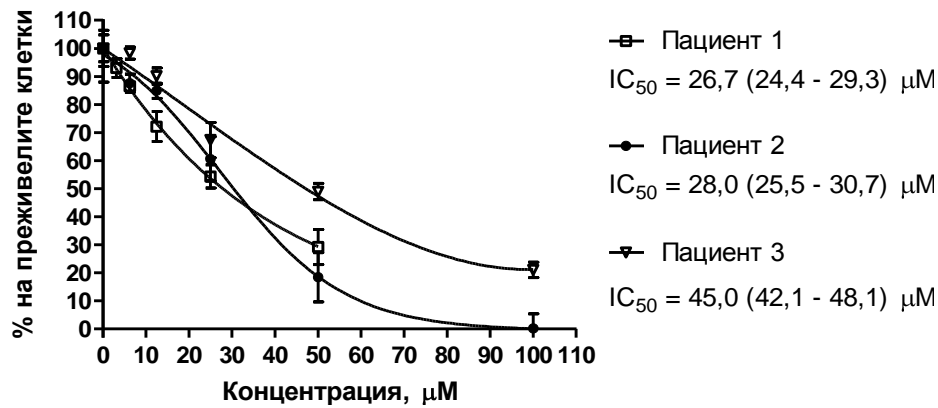
Беше потърсено допълнително потвърждение на получените данни за противомиеломен ефект на еруфозина, този път при първични култури от миеломни клетки. За целта бяха изолирани мононуклеарни клетки от костен мозък на трима пациенти с мултиплен миелом и бяха изложени на еруфозин в концентрации от 1,56 до 100 μM , при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.2. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект срещу клетките от всички пациенти. IC_{50} на Erufosine варира при отделните пациенти от 26,7 до 45 μM .



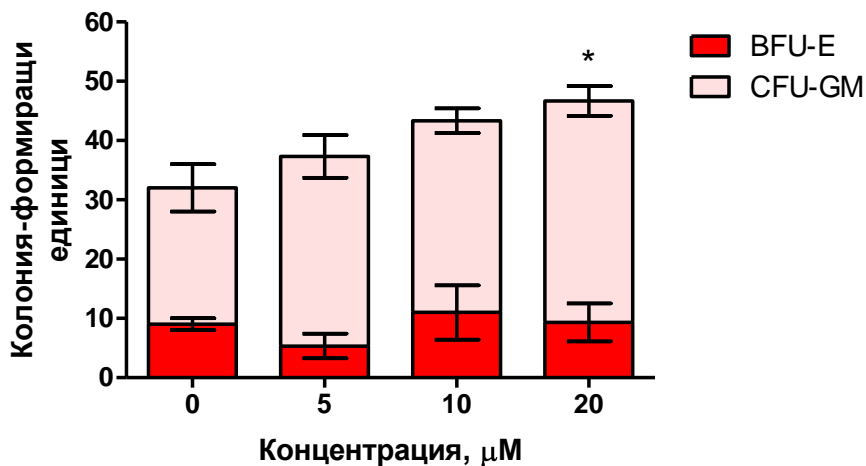
Фиг. IV.1. Цитотоксичност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с Erufosine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.

С цел да се провери дали цитотоксичното действие на еруфозина не засяга и нормалните хемопоеични клетки, беше изследвано влиянието му върху клоногенността на нормални човешки стволови клетки, изолирани от кръв от умбиликалната вена. Еруфозинът беше приложен в три различни концентрации – 5, 10 и 20 μM . Получените резултати са представени на фиг. IV.3. Вижда се, че еруфозинът всъщност стимулира стволовите клетки да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии. След въздействие с 20 μM еруфозин, броят на образувалите се колонии от този вид е със 62%

по-голям, отколкото в нетретираната контролна група. Разликата е статистически значима ($P < 0,05$). Образуването на проеритробластни (BFU-E) колонии не се повлиява от Erufosine в приложените концентрации.



Фиг. IV.2. Цитотоксичност на Erufosine спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с мултиплен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Erufosine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.



Фиг. IV.3. Еруфозинът стимулира нормални човешки стволови клетки, изолирани от пълна връв, да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии в подходяща, съдържаща стандартни количества растежни фактори диференцираща среда (MethoCult® GF H4434). Звездичката обозначава статистически значима разлика спрямо нетретираната контрола ($P < 0,05$). Образуването на проеритробластни (BFU-E) колонии не се повлиява. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

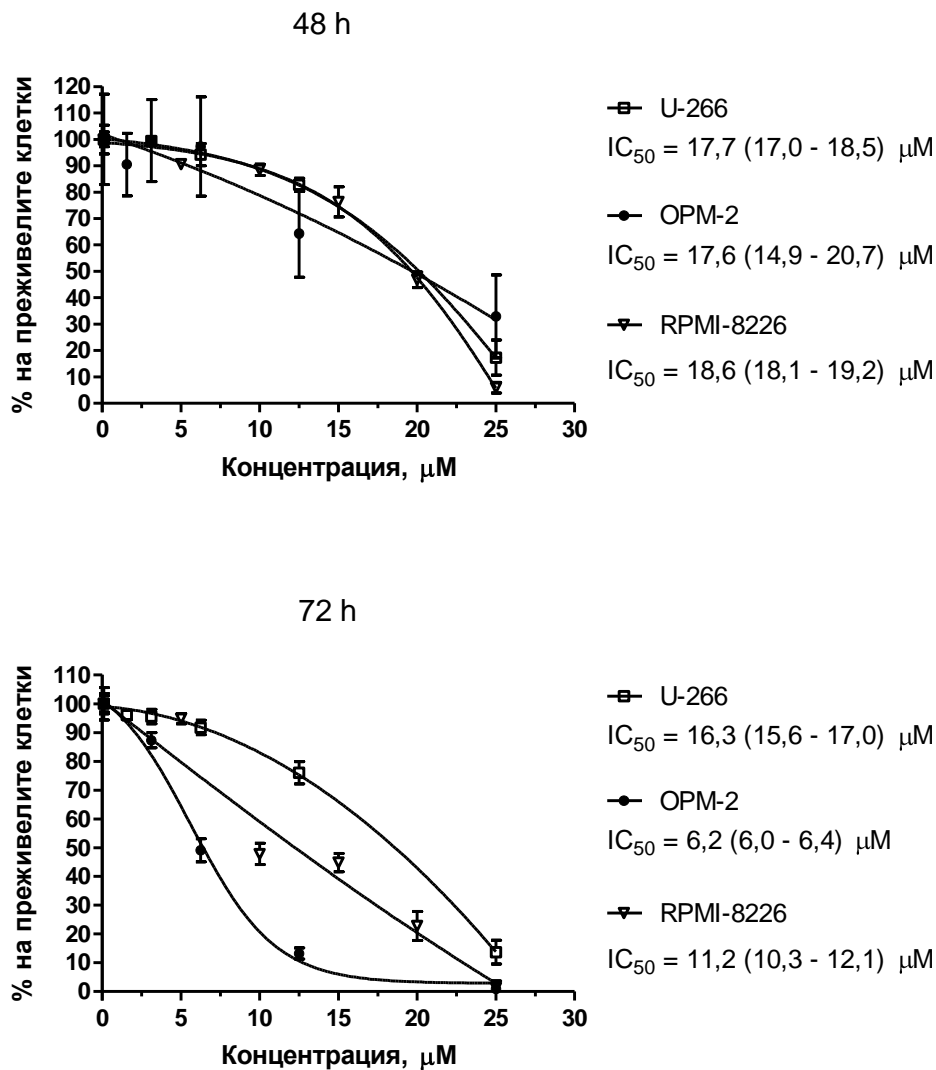
➤ **Куркумин (диферулоилметан)**

Беше изследван ефектът на куркумина върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 1,56 и 25 μM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.4. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии, като OPM-2 се откроява като по-чувствителна от другите две. IC_{50} на куркумина за тази клетъчна линия е 17,6 (14,9 - 20,7) μM при 48-часово въздействие и 6,2 (6,0 - 6,4) μM при 72-часово въздействие. Съответните IC_{50} -стойности за RPMI-8226 са 18,6 (18,1 - 19,2) μM при 48-часово въздействие и 11,2 (10,3 - 12,1) μM при 72-часово въздействие, а за U-266 – 17,7 (17,0 - 18,5) μM при 48-часово въздействие и 16,3 (15,6 - 17,0) μM при 72-часово въздействие. Куркумин, приложен в концентрация 25 μM за 72 часа, постига почти пълно унищожаване на клетки OPM-2 и RPMI-8226 и довежда броя на жизнеспособните U-266 до 13,7% от този в съответната нетретирана контрола.

Беше потърсено допълнително потвърждение на получените данни за противомиеломен ефект на куркумина, този път при първични култури от миеломни клетки. За целта бяха изолирани мононуклеарни клетки от костен мозък на трима пациенти с мултиплиен миелом и бяха изложени на куркумин в концентрации от 6,25 до 50 μM , при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.5. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект срещу клетките от всички пациенти. IC_{50} на куркумина варира при отделните пациенти от 21,3 до 47,8 μM .

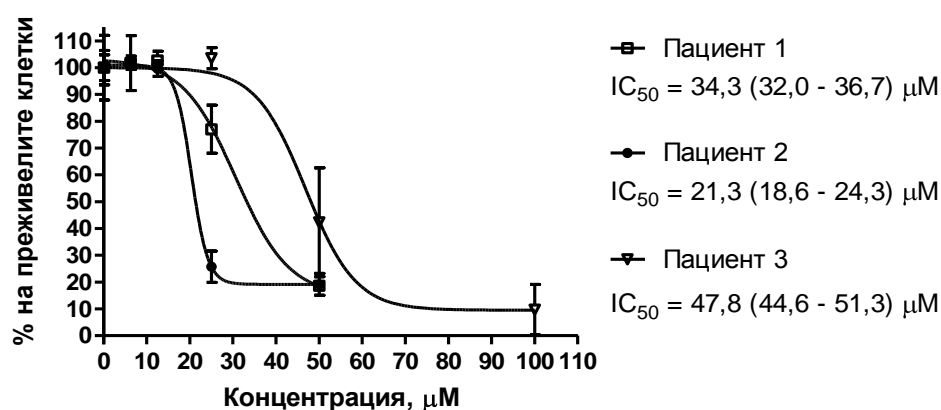
➤ **Диарсенов триоксид (арсеник, As_2O_3 , АТО)**

Беше изследван ефектът на диарсеновия триоксид върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 0,31 и 5 μM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.6. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. IC_{50} на As_2O_3 за клетъчната линия U-266 е 1,38 (1,32 - 1,44) μM при 48-часово въздействие и 0,78 (0,73 - 0,84) μM при 72-часово въздействие. Съответните IC_{50} -стойности за OPM-2 са 0,92 (0,87 - 0,97) μM при 48-часово въздействие и 0,91 (0,86 - 0,96) μM при 72-часово въздействие, а за RPMI-8226 – 1,13 (1,09 - 1,18) μM при 48-часово въздействие и 1,32 (1,26 - 1,38) μM при 72-часово въздействие. As_2O_3 , приложен в концентрация 5 μM за 72 часа, постига почти пълно унищожаване на изследваните миеломни клетки.



Фиг. IV.4. Цитотоксичност на куркумин спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с куркумин. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.

Противомиеломният ефект на диарсеновия триоксид беше изследван и върху първична култура от мононуклеарни клетки от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Клетките бяха изложени на As₂O₃ в концентрации от 0,31 до 5 µM, при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.7. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект, а установената IC₅₀ е около 4,8 µM.



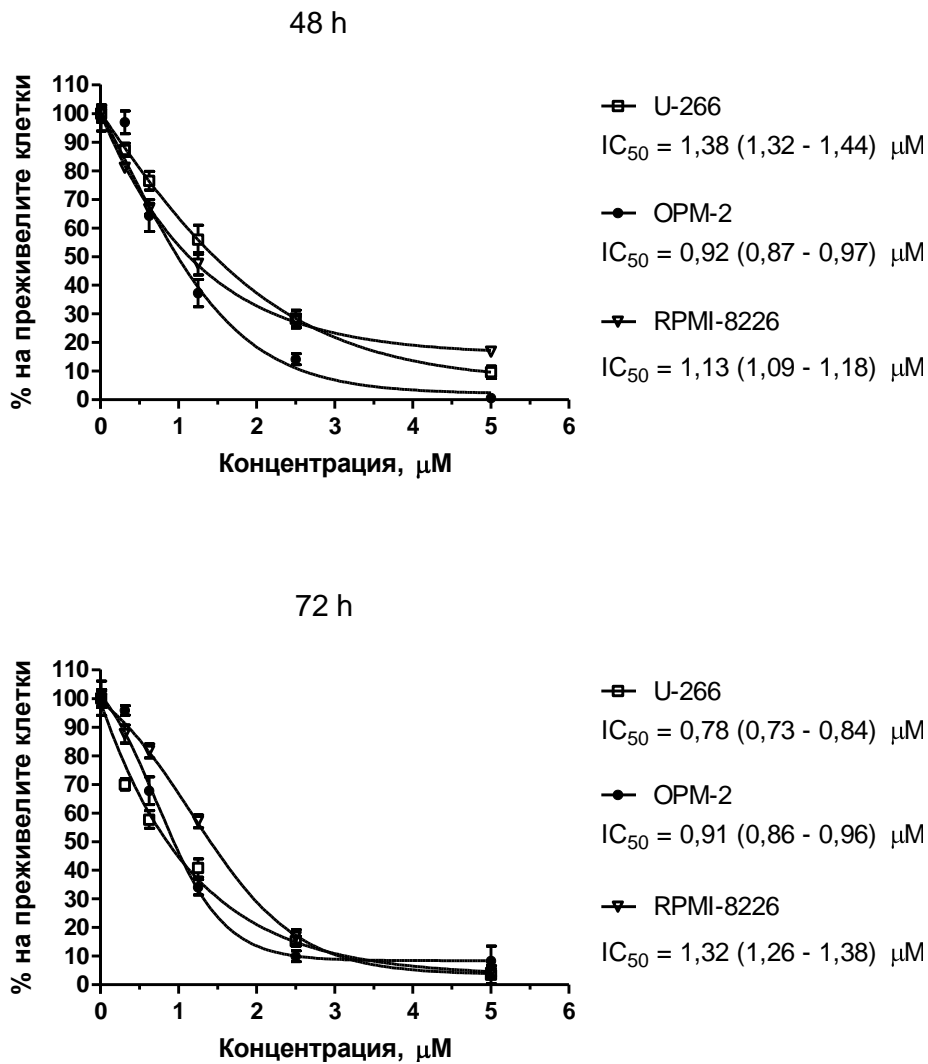
Фиг. IV.5. Цитотоксичност на куркумин спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с мултиплиен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с куркумин. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретирания контрол, 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.

➤ Мелфалан (Melphalan)

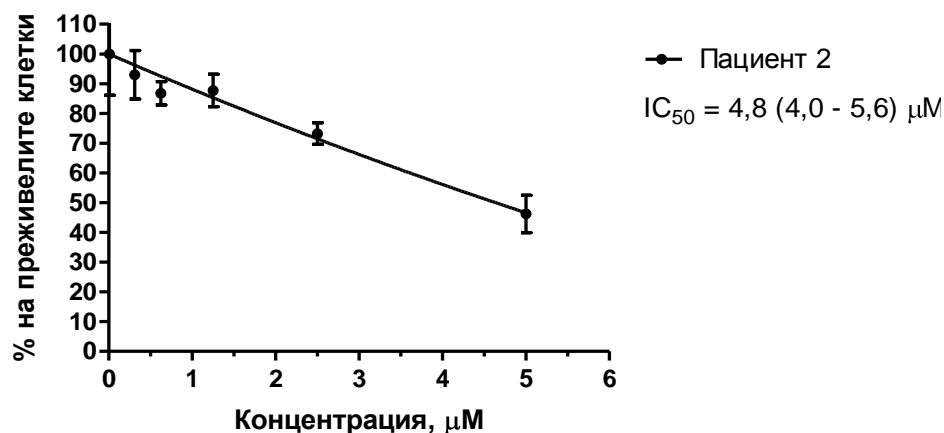
Беше изследван ефектът на мелфалана върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 3,13 и 100 μM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.8. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. U-266 и OPM-2 се открояват като по-чувствителни в сравнение с RPMI-8226. IC_{50} на Melphalan за клетъчната линия U-266 е 32,4 (31,2 - 33,8) μM при 48-часово въздействие и 12,8 (10,8 - 15,2) μM при 72-часово въздействие. Съответните IC_{50} -стойности при OPM-2 са 22,4 (20,7 - 24,2) μM при 48-часово въздействие и 16,5 (14,8 - 18,5) μM при 72-часово въздействие. Мелфалан, приложен в концентрация 50 μM за 72 часа, постига почти пълно унищожаване на клетки OPM-2 и довежда броя на жизнеспособните U-266 до 16,7% от този в съответната нетретирания контрол. IC_{50} на Melphalan за клетъчната линия RPMI-8226 е 33,7 (29,8 - 38,1) μM при 48-часово въздействие и 37,0 (34,3 - 39,8) μM при 72-часово въздействие, а концентрацията необходима за пълно унищожаване на тези клетки е около 100 μM .

Противомиеломният ефект на мелфалана беше изследван и върху първични култури от мононуклеарни клетки от костен мозък на пациенти с мултиплиен миелом. Клетките бяха изложени на Melphalan в концентрации от 6,25 до 100 μM , при време на въздействи-

вие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.9. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект срещу клетките от всички пациенти. IC_{50} на мелфалана варира при отделните пациенти от 13,5 до 29,5 μM .



Фиг. IV.6. Цитотоксичност на диарсенов триоксид спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с As_2O_3 . Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.

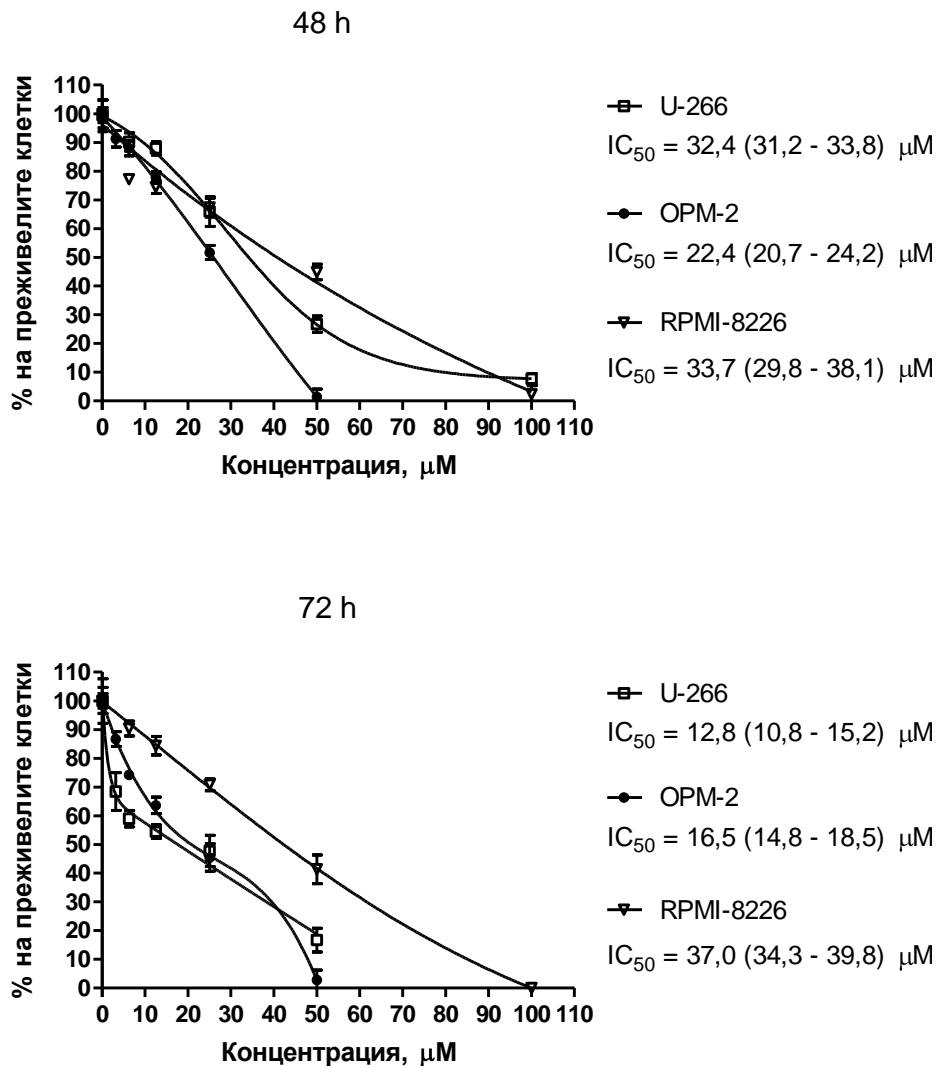


Фиг. IV.7. Цитотоксичност на диарсенов триоксид спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с As₂O₃. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. След нелинеен регресионен анализ са получени представените графика и IC₅₀-стойност с 95%-доверителен интервал. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

➤ Бендамустин (Bendamustine)

Беше изследван ефектът на бендамустина върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 12,5 и 200 µM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.10. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. U-266 се откроява като най-резистентна към Bendamustine при време на въздействие 48 часа и най-чувствителна при време на въздействие 72 часа – съответните IC₅₀-стойности са 183,2 (173,1 - 193,8) µM и 72,9 (66,1 - 80,5) µM. IC₅₀-стойностите за OPM-2 са 122,5 (113,5 - 132,1) µM при 48-часово въздействие и 200,6 (183,3 - 219,4) µM при 72-часово въздействие, а за RPMI-8226 – 122,4 (114,3 - 131,2) µM при 48-часово въздействие и повече от 200 µM при 72-часово въздействие. 72 часа след третиране с ниски концентрации бендамустин (6,25 - 12,5 µM) се наблюдава повишена пролиферация на клетки OPM-2.

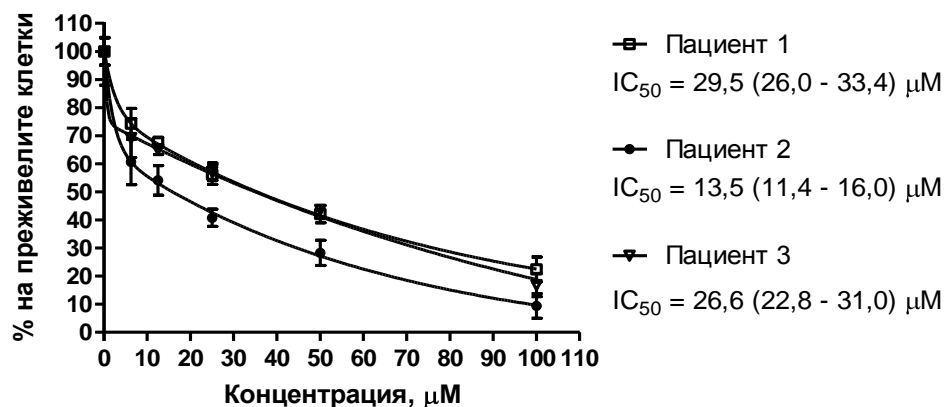
Противомиеломният ефект на бендамустина беше изследван и върху първични култури от мононуклеарни клетки от костен мозък на пациенти с мултиплен миелом. Клетките бяха изложени на Bendamustine в концентрации от 12,5 до 200 µM, при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.11. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект срещу клетките от всички пациенти. IC₅₀ на мелфалана варира при отделните пациенти от 167 до 200 µM.



Фиг. IV.8. Цитотоксичност на Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.

➤ Бортезомиб (Bortezomib)

Беше изследван ефектът на бортезомиба върху преживяемостта на миеломни клетки от линиите U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Бяха използвани концентрации между 0,31 и 10 nM и две различни времена на въздействие – 48 и 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.12. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. U-266 и OPM-2 се открояват като по-чувствителни в



Фиг. IV.9. Цитотоксичност на Melphalan спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретирания 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.

сравнение с RPMI-8226. IC_{50} на Vortezomib за клетъчната линия U-266 е 0,8 (1,1 - 0,6) nM при 48-часово въздействие и 1,6 (1,5 - 1,7) nM при 72-часово въздействие. Съответните IC_{50} -стойности при OPM-2 са 1,9 (1,5 - 2,5) nM при 48-часово въздействие и 1,7 (1,6 - 1,7) nM при 72-часово въздействие. Бортезомиб, приложен в концентрация 5 nM за 72 часа, постига почти пълно унищожаване на тези два вида миеломни клетки. IC_{50} на Vortezomib за клетъчната линия RPMI-8226 е 2,9 (2,8 - 3,0) nM при 48-часово въздействие и 3,5 (3,4 - 3,6) nM при 72-часово въздействие, а концентрацията необходима за пълно унищожаване на тези клетки е около 10 nM.

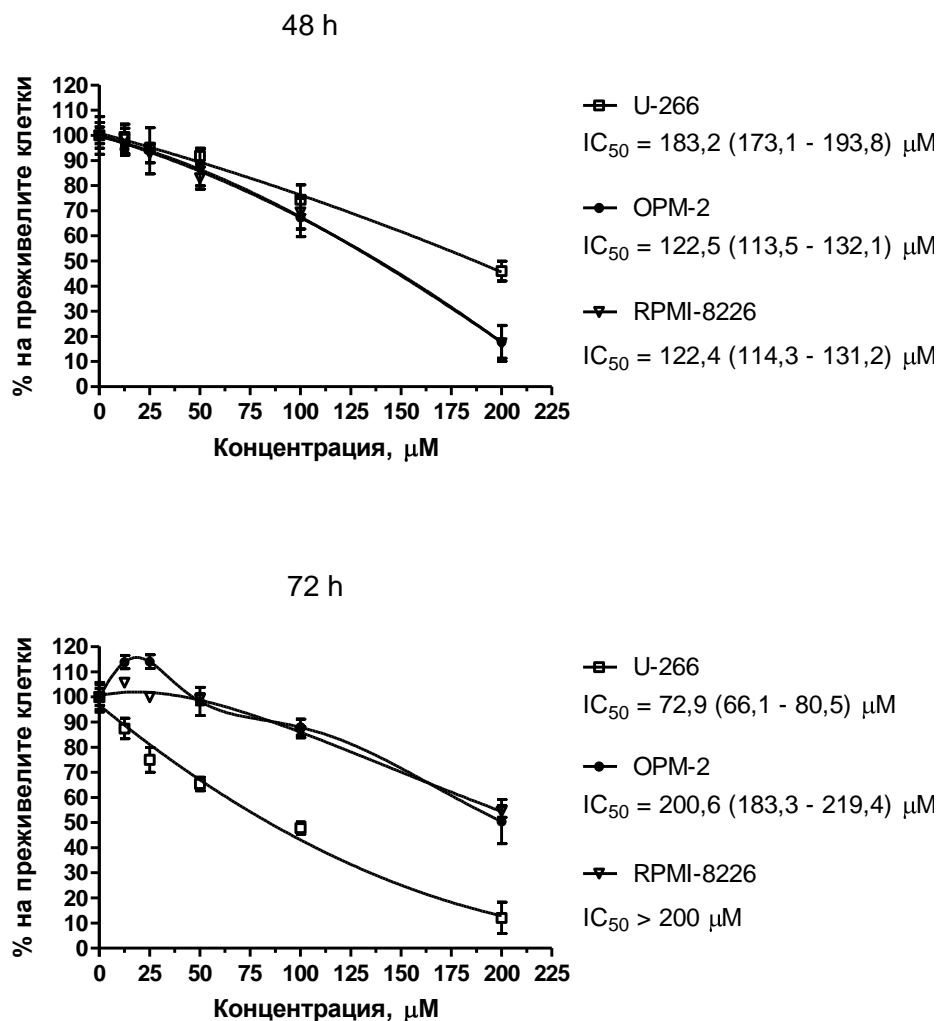
Противомиеломният ефект на бортезомиба беше изследван и върху първична култура от мононуклеарни клетки от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Клетките бяха изложени на Vortezomib в концентрации от 0,63 до 5 nM, при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.13. Наблюдава се концентрационно-зависим цитотоксичен ефект, а установената IC_{50} е около 6,9 nM.

1.1.2. Комбинационни цитотоксични ефекти при едновременно приложение на две вещества

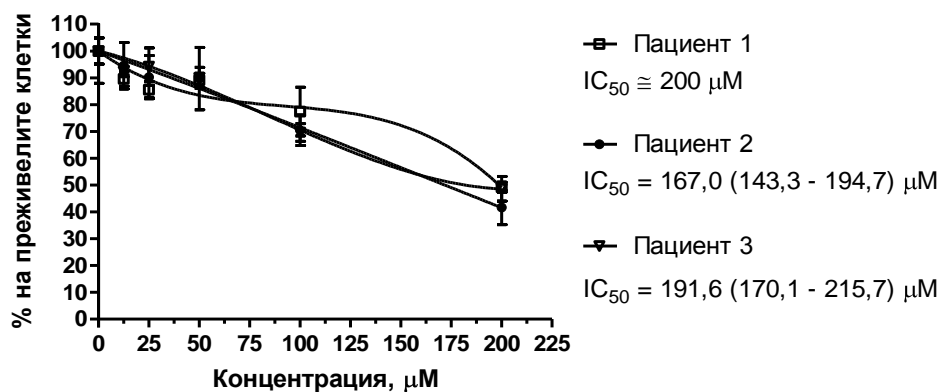
Бяха изследвани комбинационните цитотоксични ефекти при едновременно приложение на две различни вещества с установено противомиеломно действие. Изследва-

нията бяха проведени *in vitro* върху клетъчните линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Времето на въздействие във всички случаи беше 72 часа.

Получените резултати при съвместно приложение на **Erufosine** и **Melphalan** са представени на фиг. IV.14. Вижда се, че върху клетки U-266 някои дозови вариации на тази комбинация (10 μM Erufosine + 5 или 10 μM Melphalan) имат по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В единия от тези случаи (10 μM Erufosine + 10 μM Melphalan) разли-



Фиг. IV.10. Цитотоксичност на Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.



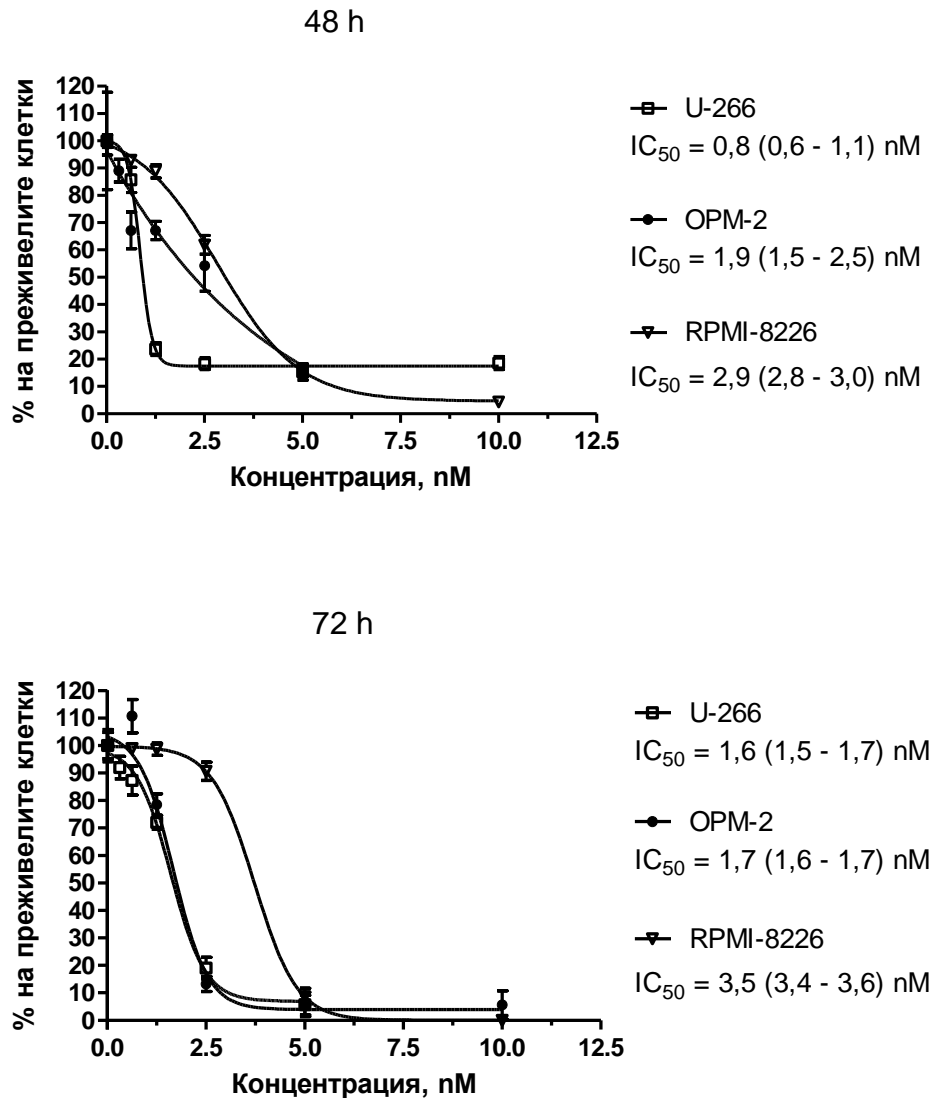
Фиг. IV.11. Цитотоксичност на Bendamustine спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.

ката е особено голяма (26,5% преживели клетки при очаквани 43,4%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Точно обратно, върху клетки ОРМ-2 някои дозови вариации на комбинацията (5 μM Erufosine + 5 или 10 μM Melphalan) имат по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В единия от тези случаи (5 μM Erufosine + 5 μM Melphalan) разликата е по-голяма и отговаря на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Върху клетки RPMI-8226 някои дозови вариации на комбинацията (5 μM Erufosine + 10 μM Melphalan) имат по-голям, а други (2,5 μM Erufosine + 5 или 10 μM Melphalan) – по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества.

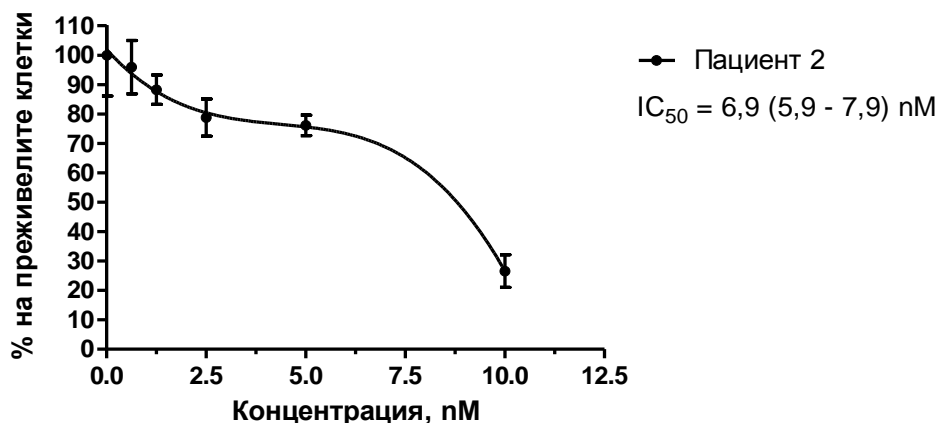
Получените резултати при съвместно приложение на **Erufosine и Bendamustine** са представени на фиг. IV.15. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (2,5 или 5 μM Erufosine + 75 или 150 μM Bendamustine) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В единия от тези случаи (5 μM Erufosine + 150 μM Bendamustine) разликата е особено голяма (29,1% преживели клетки при очаквани 48,1%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Върху клетки U-266 повечето изследвани дозови вариации (20 μM Erufosine + 50 или 100 μM Bendamustine; 10 μM Erufosine + 100 μM Bendamustine) също имат по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитив-

но взаимодействие между двете вещества ($P < 0,05$). Върху клетки OPM-2 една от изследваните дозови вариации (2,5 μM Erufosine + 100 μM Vendamustine) има по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В останалите случаи се наблюдава адитивност на ефектите.

На фиг. IV.16. са представени получените резултати при съвместно приложение на **Erufosine** и **Bortezomib**. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 някои дозови вариации



Фиг. IV.12. Цитотоксичност на Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с Bortezomib. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната 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.



Фиг. IV.13. Цитотоксичност на Vortezomib спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациент с мултиплен миелом. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Vortezomib. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. След нелинеен регресионен анализ са получени представената графика и IC_{50} -стойност с 95%-доверителен интервал. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

на тази комбинация (5 нМ Vortezomib + 2,5 или 5 μ М Erufosine) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликите са големи (10,8% преживели клетки при очаквани 39,6% в първия случай и 0% преживели клетки при очаквани 14,4% във втория случай) и отговарят на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Аналогични резултати са получени при клетъчни линии U-266 (20 μ М Erufosine + 2 нМ Vortezomib) и OPM-2 (2,5 μ М Erufosine + 2 нМ Vortezomib). При тези две клетъчни линии обаче има и случаи, когато отчетеният цитотоксичен ефект е малко по-малък от очаквания при адитивно взаимодействие между двете вещества (20 μ М Erufosine + 4 нМ Vortezomib при клетки U-266; 5 μ М Erufosine + 1 нМ Vortezomib при клетки OPM-2; $P < 0,05$).

Получените резултати при съвместно приложение на **Erufosine** и **куркумин** са представени на фиг. IV.17. Вижда се, че върху клетки OPM-2 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (2,5 или 5 μ М Erufosine + 2,5 или 5 μ М куркумин) имат значително по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$ за случаите с 5 μ М куркумин; $P < 0,05$ за случаите с 2,5 μ М куркумин). В някои от тези случаи (2,5 μ М Erufosine + 5 μ М куркумин; 5 μ М Erufosine + 2,5 или 5 μ М куркумин) разликата е особено голяма и отговаря на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Върху клетки RPMI-8226

Фиг. IV.14. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Erufosine и Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

Е – Erufosine;

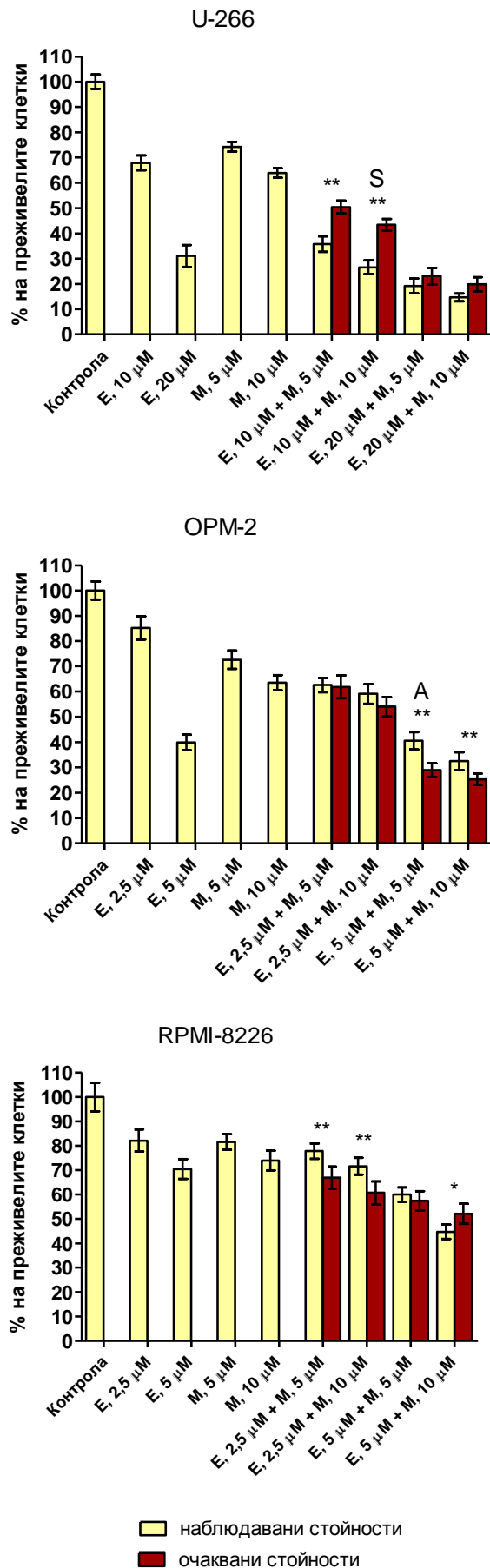
М – Melphalan;

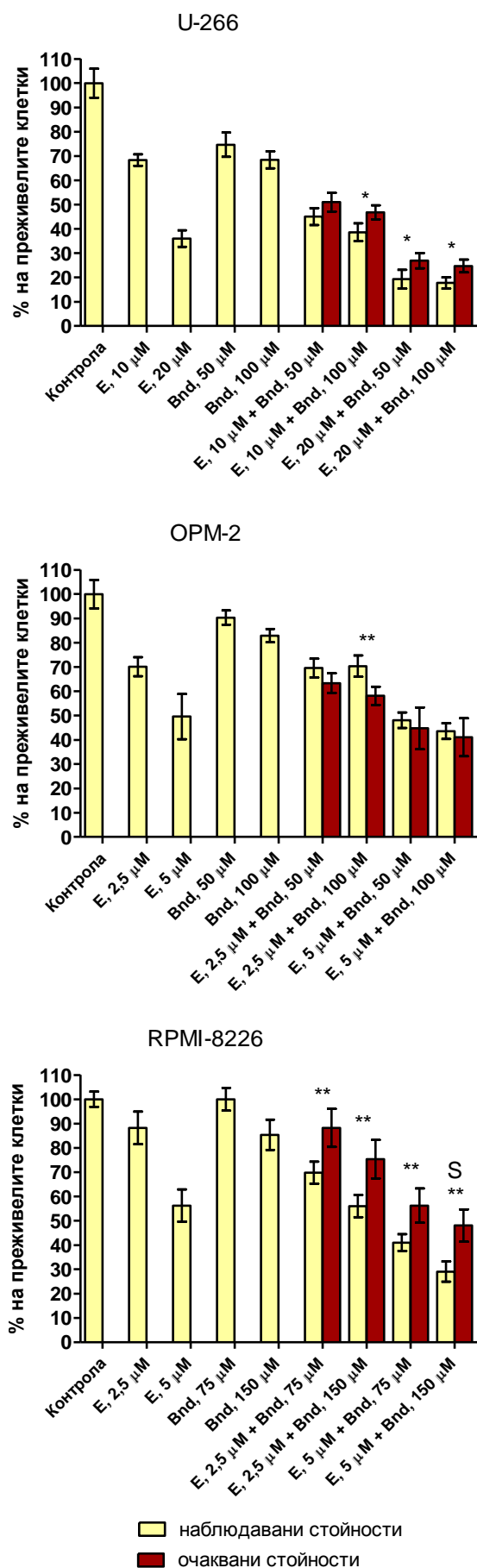
една звездичка – статистически значима разлика ($P < 0,05$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(набл.)}$);

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





Фиг. IV.15. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Erufosine и Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

E – Erufosine;

Bnd – Bendamustine;

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

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

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

Фиг. IV.16. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Erufosine и Bortezomib. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

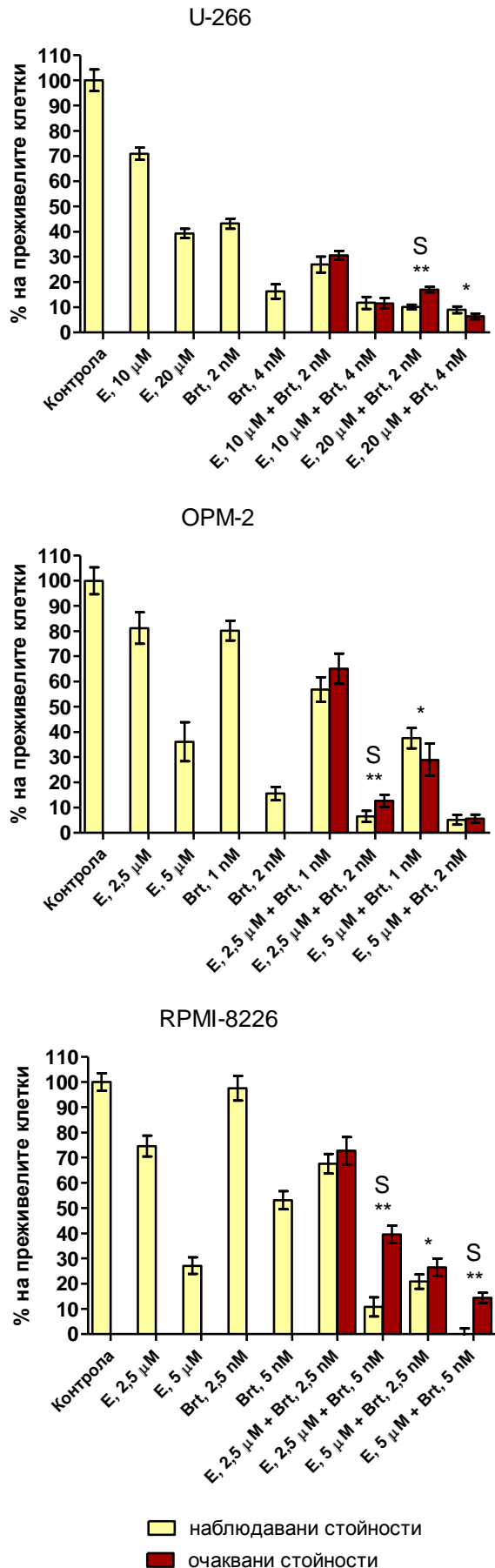
E – Erufosine;

Brt – Bortezomib;

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 потенциране на цитотоксичния ефект ($SF_{A+B(набл.)} \leq 0,7 \times SF_{A+B(оч.)}$).



някои от изследваните дозови вариации (5 μM Erufosine + 5 или 10 μM куркумин) също имат по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$) и отново са изпълнени критериите за антагонистично взаимодействие. В останалите случаи при тази клетъчна линия, както и във всички случаи при клетъчна линия U-266, се наблюдава адитивност на цитотоксичните ефекти на двете вещества.

На фиг. IV.18. са представени получените резултати при съвместно приложение на **Erufosine** и **As₂O₃**. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 някои дозови вариации на тази комбинация (2,5 μM Erufosine + 1 или 2 μM As₂O₃) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликата във втория случай (2 μM As₂O₃) е голяма (33,7% преживели клетки при очаквани 53,4%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. В друга дозова вариация обаче (5 μM Erufosine + 1 μM As₂O₃), наблюдаваният цитотоксичен ефект е значително по-малък от адитивния ($P < 0,01$) и са изпълнени критериите за антагонистично взаимодействие. Върху клетки U-266 някои дозови вариации (2 μM As₂O₃ + 10 или 20 μM Erufosine) също имат значително по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$), при което също са изпълнени критериите за антагонистично взаимодействие. В останалите случаи при тази клетъчна линия, както и във всички случаи при клетъчна линия OPM-2, се наблюдава адитивност на цитотоксичните ефекти на двете вещества.

Получените резултати при съвместно приложение на **куркумин** и **Melphalan** са представени на фиг. IV.19. Вижда се, че върху клетки U-266 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (5 или 10 μM куркумин + 5 или 10 μM Melphalan) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В един от тези случаи (10 μM куркумин + 10 μM Melphalan) разликата е особено голяма (30,1% преживели клетки при очаквани 70,4%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Комбинационните цитотоксични ефекти срещу клетки OPM-2 и RPMI-8226, при всички изследвани дозови вариации, са равни или много близки до очакваните при адитивно взаимодействие между двете вещества.

На фиг. IV.20. са представени получените резултати при съвместно приложение на **куркумин** и **Bendamustine**. Вижда се, че върху клетки U-266 и RPMI-8226 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (5 или 10 μM куркумин + 50 или 100 μM

Фиг. IV.17. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и куркумин спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Erufosine и куркумин. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

Е – Erufosine;

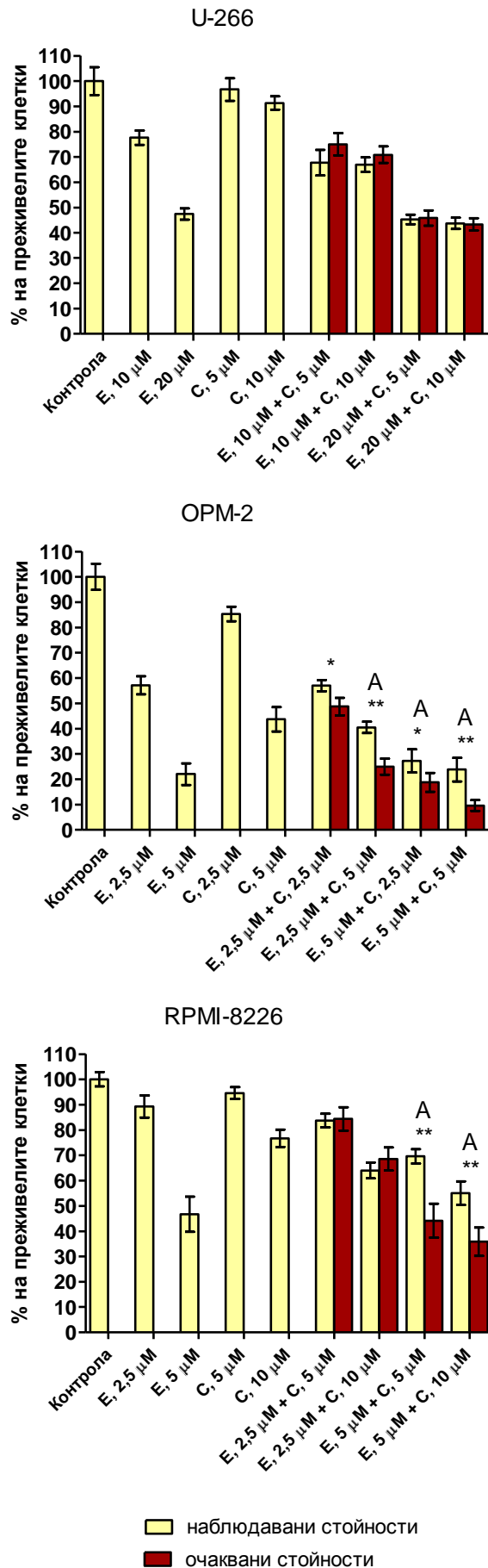
С – куркумин;

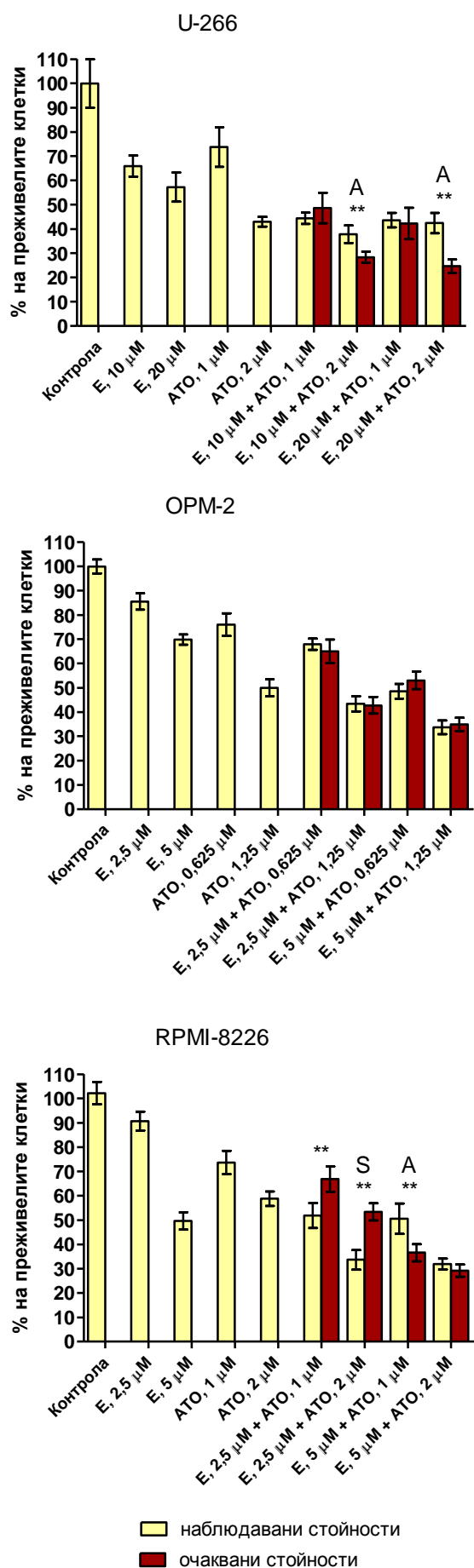
една звездичка – статистически значима разлика ($P < 0,05$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(набл.)}$);

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

A – антагонизъм

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





Фиг. IV.18. Комбинирана цитотоксичност на Erufosine и As₂O₃ спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Erufosine и As₂O₃. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

E – Erufosine;

ATO – As₂O₃;

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

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

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

Фиг. IV.19. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с куркумин и Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

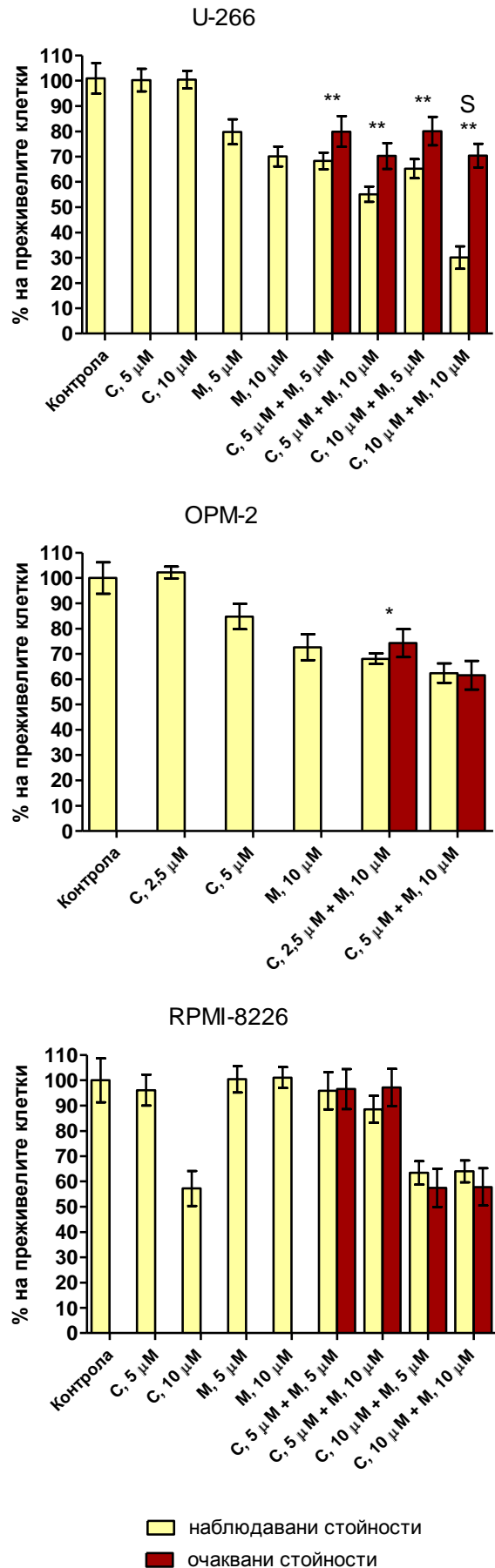
C – куркумин;

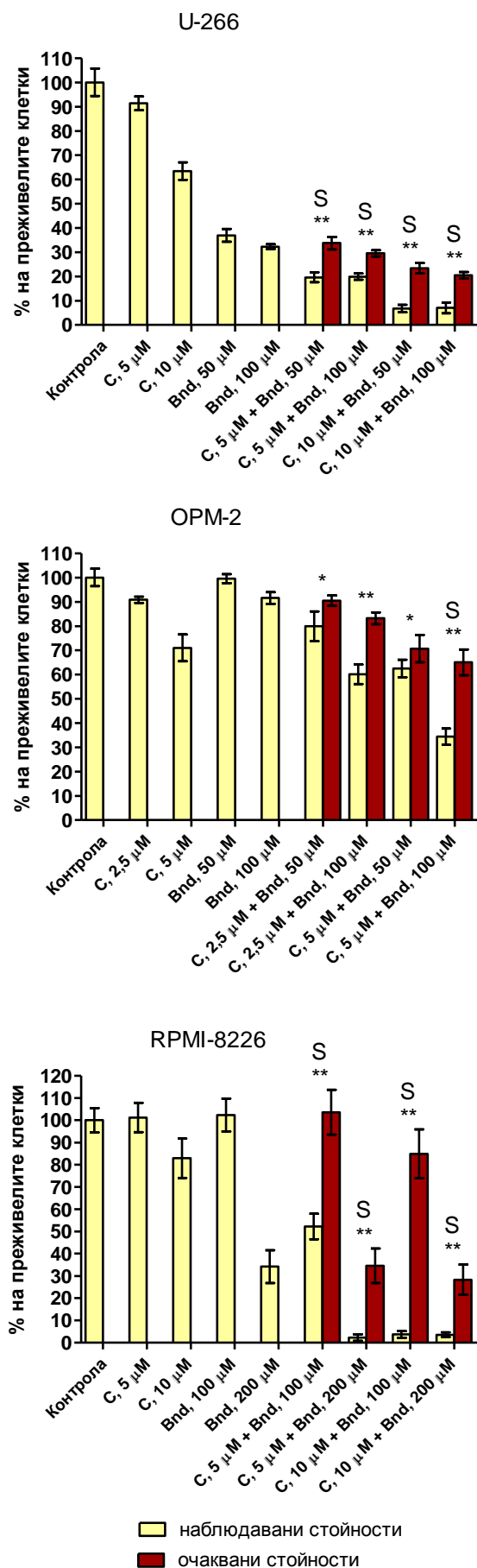
M – Melphalan;

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 потенциране на цитотоксичния ефект ($SF_{A+B(набл.)} \leq 0,7 \times SF_{A+B(оч.)}$).





Фиг. IV.20. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третирание с куркумин и Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

C – куркумин;

Bnd – Bendamustine;

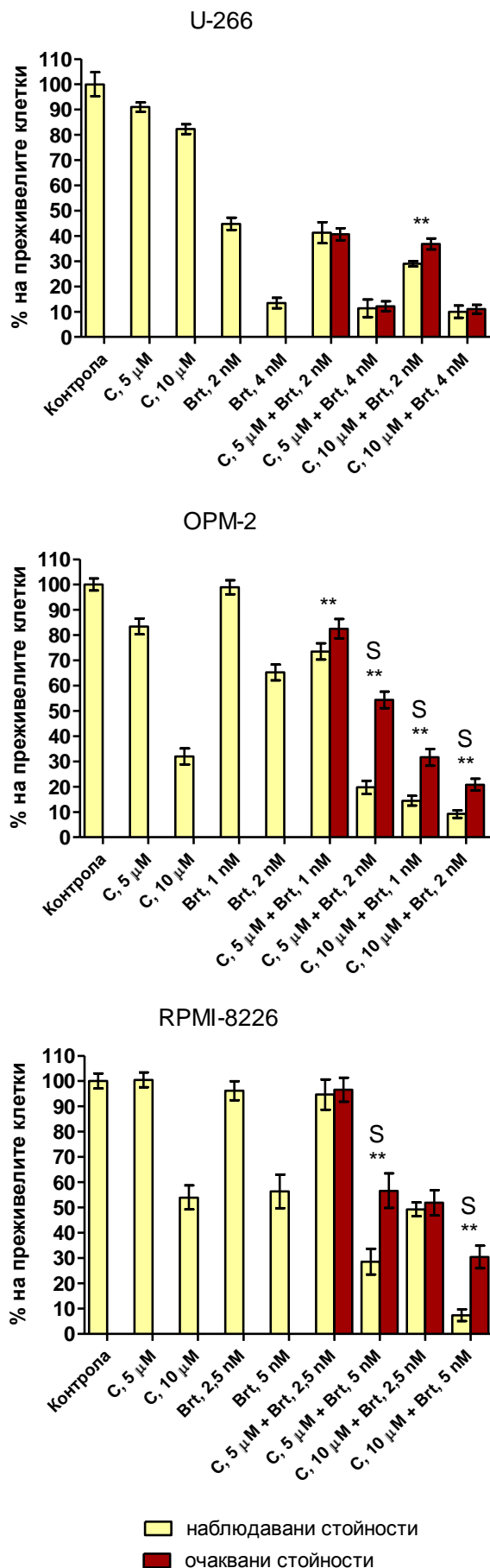
една звездичка – статистически значима разлика ($P < 0,05$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(наб.)}$);

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

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

Bendamustine за клетки U-266; 5 или 10 μM куркумин + 100 или 200 μM Bendamustine за клетки RPMI-8226) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Във всички тези случаи разликата е голяма и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Така например, процентът на преживелите клетки U-266 е: 19,6% вместо очаквани 33,7% след третиране с 5 μM куркумин + 50 μM Bendamustine; 19,9% вместо очаквани 29,5% след третиране с 5 μM куркумин + 100 μM Bendamustine; 6,8% вместо очаквани 23,4% след третиране с 10 μM куркумин + 50 μM Bendamustine; 7,1% вместо очаквани 20,5% след третиране с 10 μM куркумин + 100 μM Bendamustine. Процентът на преживелите клетки RPMI-8226 е: 52,2% вместо очаквани 103,6% след третиране с 5 μM куркумин + 100 μM Bendamustine; 2,3% вместо очаквани 34,6% след третиране с 5 μM куркумин + 200 μM Bendamustine; 3,7% вместо очаквани 84,9% след третиране с 10 μM куркумин + 100 μM Bendamustine; 3,5% вместо очаквани 28,3% след третиране с 10 μM куркумин + 200 μM Bendamustine. Също и върху клетки OPM-2 всички изследвани дозови вариации на комбинацията (5 или 10 μM куркумин + 50 или 100 μM Bendamustine) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$ за случаите със 100 μM Bendamustine; $P < 0,05$ за случаите с 50 μM Bendamustine). В един от случаите (5 μM куркумин + 100 μM Bendamustine) разликата е по-голяма (34,4% преживели клетки при очаквани 65,1%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие.

Получените резултати при съвместно приложение на **куркумин и Bortezomib** са представени на фиг. IV.21. Вижда се, че върху клетки OPM-2 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (5 или 10 μM куркумин + 1 или 2 nM Bortezomib) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В някои от тези случаи (5 μM куркумин + 2 nM Bortezomib; 10 μM куркумин + 1 или 2 nM Bortezomib) разликата е особено голяма и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Така например, процентът на преживелите клетки е: 19,8% вместо очаквани 54,4% след третиране с 5 μM куркумин + 2 nM Bortezomib; 14,4% вместо очаквани 31,6% след третиране с 10 μM куркумин + 1 nM Bortezomib; 9,2% вместо очаквани 20,8% след третиране с 10 μM куркумин + 2 nM Bortezomib. Върху клетки RPMI-8226 някои дозови вариации на комбинацията (5 nM Bortezomib + 5 или 10 μM куркумин) също имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодей-



Фиг. IV.21. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с куркумин и Bortezomib. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

C – куркумин;

Brt – Bortezomib;

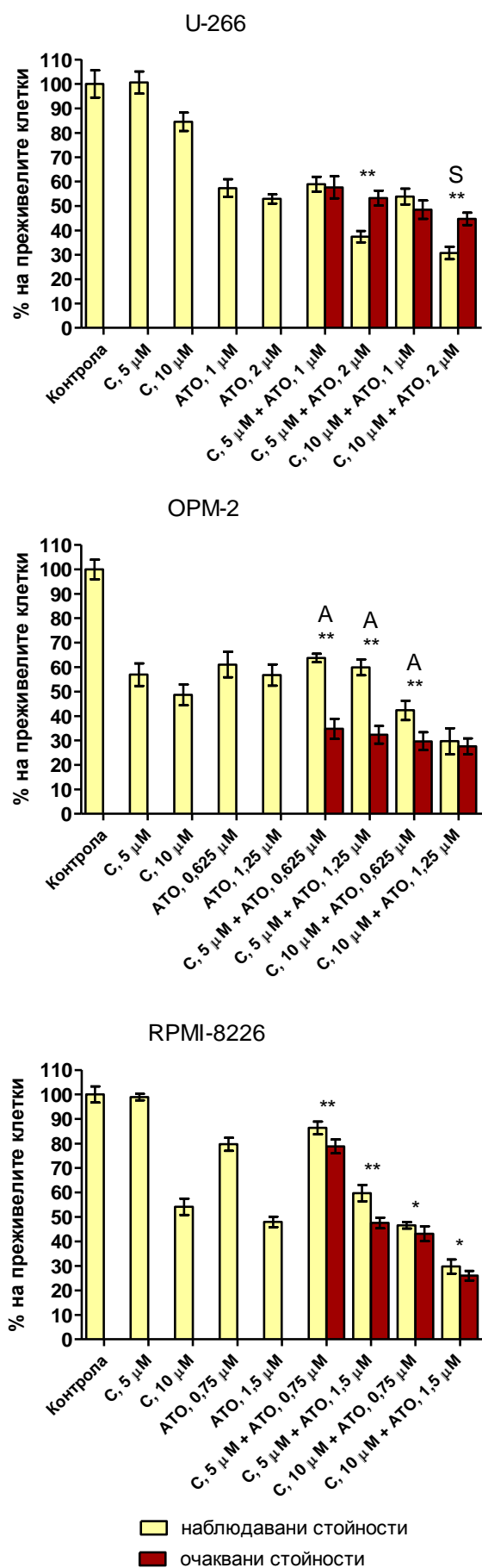
две звездички – статистически значима разлика ($P < 0,01$) между съответните очаквана ($SF_{A+B(оч.)}$) и експериментално наблюдавана преживяемост на клетките ($SF_{A+B(набл.)}$);

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

вие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликите са големи (28,6% преживели клетки при очаквани 56,6% в първия случай и 7,3% преживели клетки при очаквани 30,4% във втория случай) и отговарят на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Върху клетки U-266 една от изследваните дозови вариации (10 μM куркумин + 2 nM Bortezomib) има по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В останалите случаи се наблюдава адитивност на ефектите.

На фиг. IV.22. са представени получените резултати при съвместно приложение на **куркумин и As_2O_3** . Вижда се, че върху клетки U-266 някои дозови вариации на тази комбинация (2 μM As_2O_3 + 5 или 10 μM куркумин) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликата във втория случай (10 μM куркумин) е голяма (30,8% преживели клетки при очаквани 44,7%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Върху клетки OPM-2 обаче, три от изследваните дозови вариации (5 μM куркумин + 0,625 или 1,25 μM As_2O_3 ; 10 μM куркумин + 0,625 μM As_2O_3) имат значително по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликите във всички тези случаи са големи и отговарят на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Върху клетки RPMI-8226 всички изследвани дозови вариации (5 или 10 μM куркумин + 0,75 или 1,5 μM As_2O_3) също имат по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$ за случаите с 5 μM куркумин; $P < 0,05$ за случаите с 10 μM куркумин).

Получените резултати при съвместно приложение на **As_2O_3 и Melphalan** са представени на фиг. IV.23. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 всички изследвани дозови вариации на тази комбинация (1 или 2 μM As_2O_3 + 5 или 10 μM Melphalan) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,05$ за случаите с 1 μM As_2O_3 ; $P < 0,01$ за случаите с 2 μM As_2O_3). Точно напротив, върху клетки OPM-2 някои дозови вариации на комбинацията (0,625 μM As_2O_3 + 5 или 10 μM Melphalan; 1,25 μM As_2O_3 + 5 μM Melphalan) имат по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$ за случаите с 5 μM Melphalan; $P < 0,05$ за случая с 10 μM Melphalan). Върху клетки U-266 една от изследваните дозови вариации (2 μM As_2O_3 + 5 μM Melphalan) също има по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества



Фиг. IV.22. Комбинирана цитотоксичност на куркумин и As_2O_3 спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с куркумин и As_2O_3 . Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

C – куркумин;

ATO – As_2O_3 ;

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

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

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

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

Фиг. IV.23. Комбинирана цитотоксичност на As_2O_3 и Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с As_2O_3 и Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

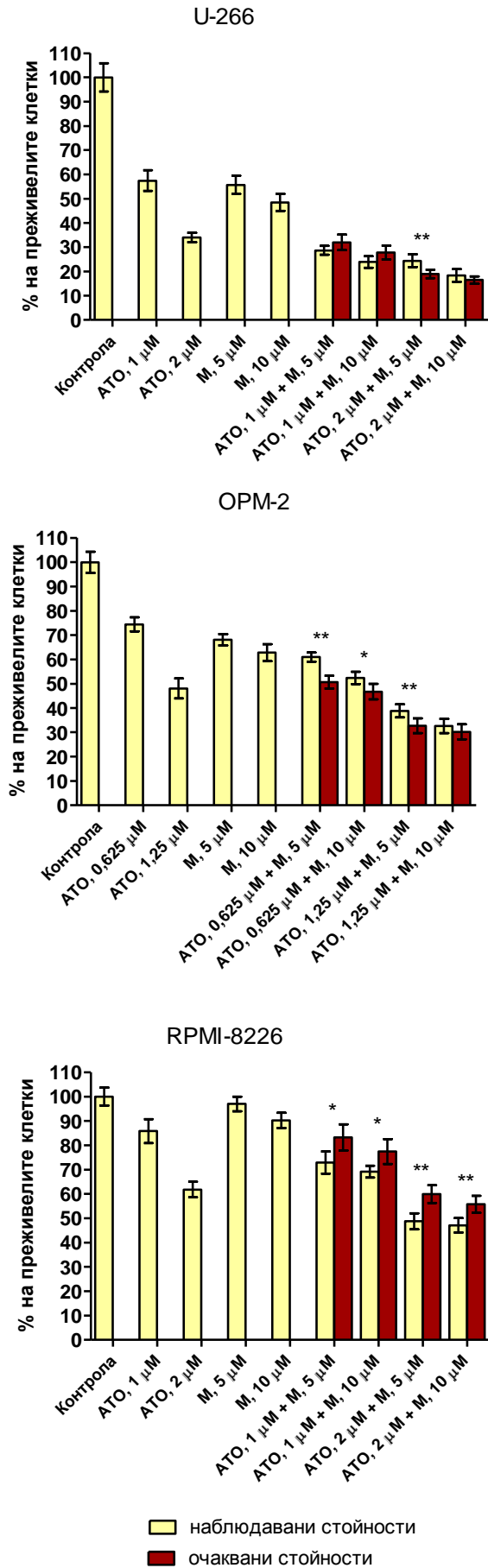
Легенда:

ATO – As_2O_3 ;

M – Melphalan;

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 ($SF_{A+B(набл.)}$).



($P < 0,01$). В останалите случаи се наблюдава адитивност на ефектите.

На фиг. IV.24. са представени получените резултати при съвместно приложение на **As₂O₃** и **Bendamustine**. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 някои дозови вариации на тази комбинация (1 μM As₂O₃ + 75 μM Bendamustine; 2 μM As₂O₃ + 75 или 150 μM Bendamustine) имат малко по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,05$). Аналогични резултати са получени в някои случаи и при клетъчни линии U-266 (1 μM As₂O₃ + 100 μM Bendamustine; $P < 0,01$) и OPM-2 (1,25 μM As₂O₃ + 20 μM Bendamustine $P < 0,05$). При останалите приложени дозови вариации се наблюдава адитивност на ефектите.

Получените резултати при съвместно приложение на **As₂O₃** и **Bortezomib** са представени на фиг. IV.25. Вижда се, че върху клетки RPMI-8226 една от изследваните дозови вариации на тази комбинация (2 μM As₂O₃ + 4 nM Bortezomib) има значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликата е голяма (31,8% преживели клетки при очаквани 50,9%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. В друга дозова вариация обаче (2 μM As₂O₃ + 2 nM Bortezomib), наблюдаваният цитотоксичен ефект е малко по-малък от адитивния ($P < 0,05$). Върху клетки U-266 някои дозови вариации (1 μM As₂O₃ + 1,5 или 3 nM Bortezomib) също имат по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). В останалите случаи се наблюдава адитивност на ефектите.

На фиг. IV.26. са представени получените резултати при съвместно приложение на **Bortezomib** и **Melphalan**. Вижда се, че върху клетки U-266 една от изследваните дозови вариации на тази комбинация (4 nM Bortezomib + 10 μM Melphalan) има по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликата е голяма (5,0% преживели клетки при очаквани 11,6%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Върху клетки RPMI-8226 една от изследваните дозови вариации (5 nM Bortezomib + 5 μM Melphalan) също има по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,05$). При клетъчна линия OPM-2 обаче, в един от случаите (2 nM Bortezomib + 5 μM Melphalan) се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Разликата е голяма и отговаря на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. По-голямата част от изследва-

Фиг. IV.24. Комбинирана цитотоксичност на As₂O₃ и Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по MTT-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с As₂O₃ и Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

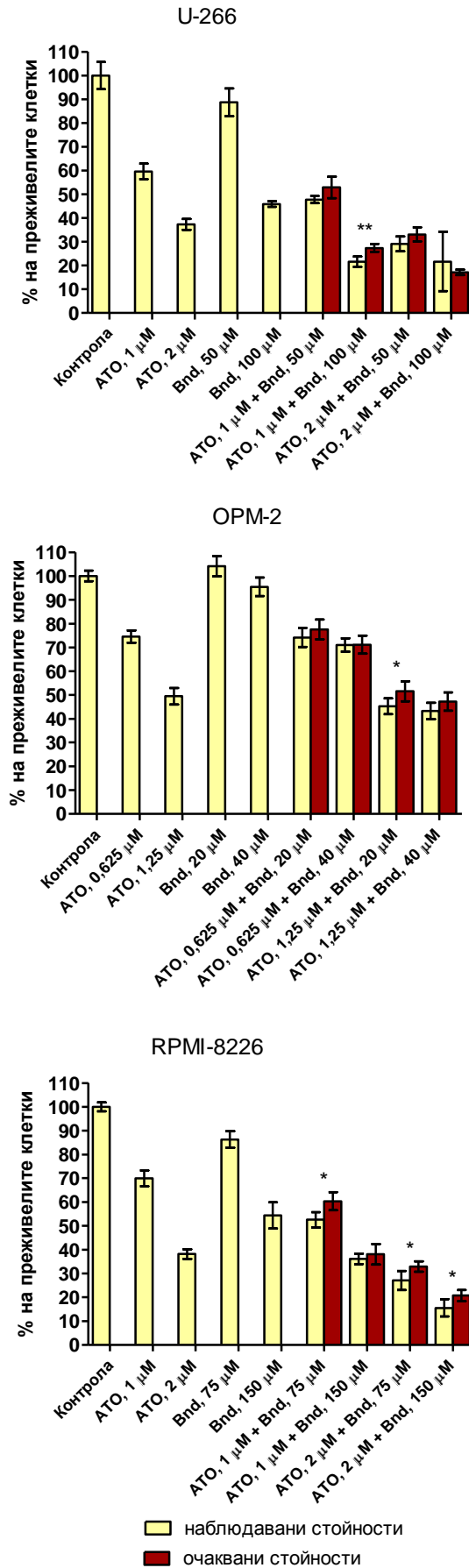
Легенда:

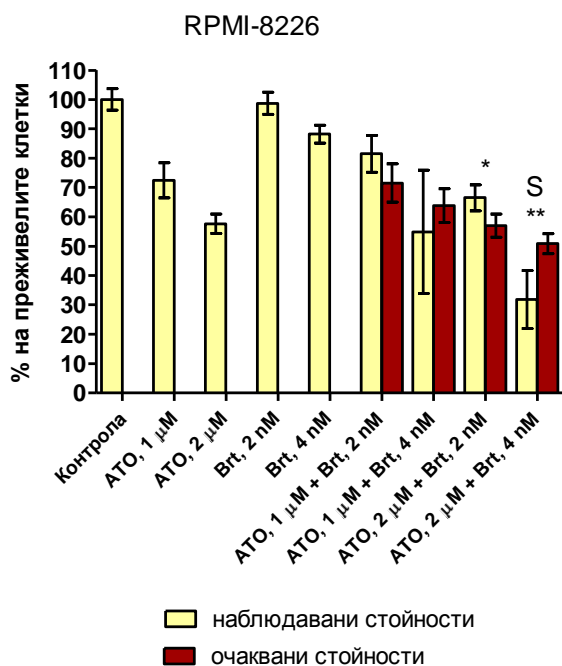
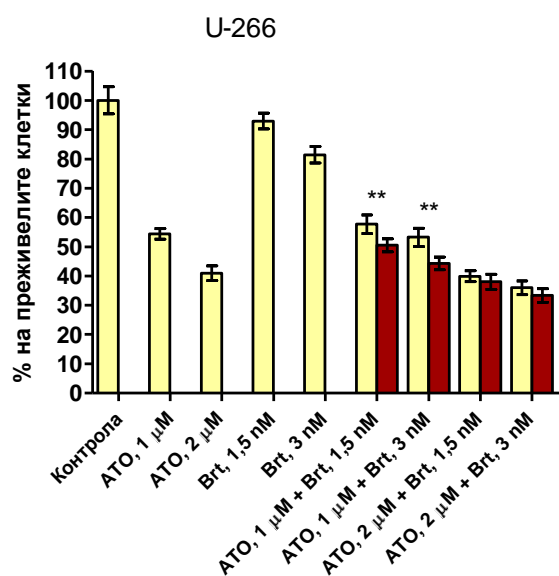
ATO – As₂O₃;

Bnd – Bendamustine;

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 ($SF_{A+B(набл.)}$).





Фиг. IV.25. Комбинирана цитотоксичност на As₂O₃ и Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с As₂O₃ и Bortezomib. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

ATO – As₂O₃;

Brt – Bortezomib;

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

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

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

Фиг. IV.26. Комбинирана цитотоксичност на Bortezomib и Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Bortezomib и Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

Brt – Bortezomib;

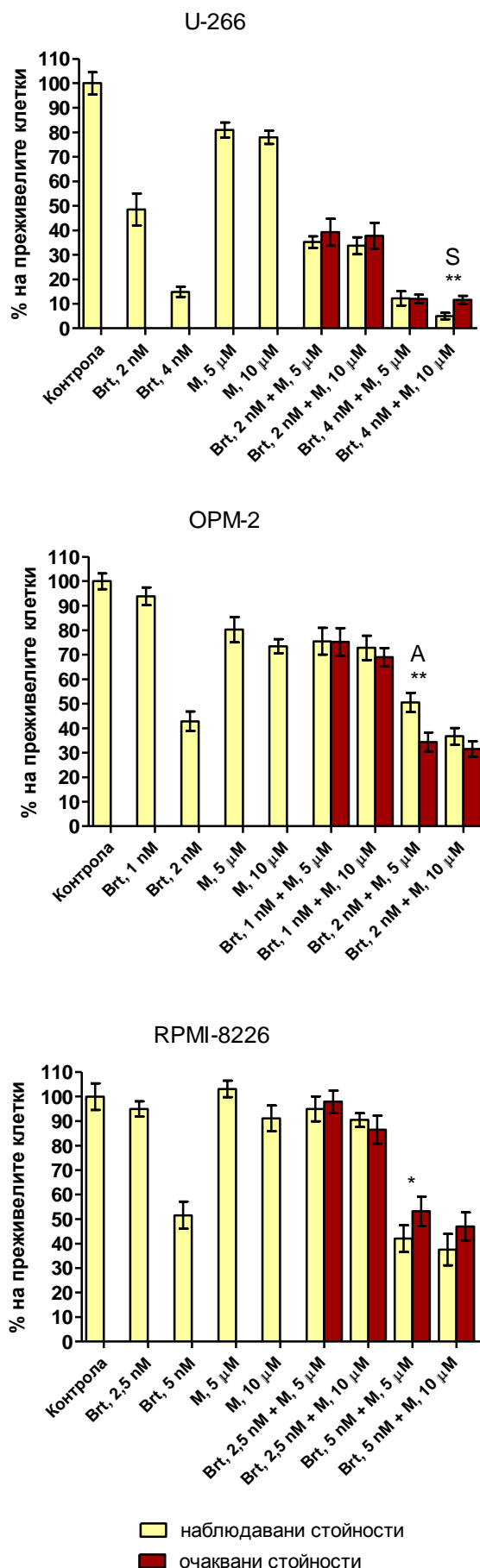
M – Melphalan;

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

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



ните дозови вариации на комбинацията Bortezomib + Melphalan се характеризират с адитивен цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии.

Получените резултати при съвместно приложение на Bortezomib и Bendamustine са представени на фиг. IV.27. Вижда се, че върху клетки U-266 две от изследваните дозови вариации на тази комбинация (1,5 nM Bortezomib + 50 µM Bendamustine; 3 nM Bortezomib + 100 µM Bendamustine) имат значително по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,05$ в първия случай и $< 0,01$ във втория). Разликата във втория случай (3 nM Bortezomib + 100 µM Bendamustine) е голяма (13,3% преживели клетки при очаквани 24,4%) и отговаря на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Върху клетки OPM-2 една от изследваните дозови вариации (1 nM Bortezomib + 50 µM Bendamustine) също има по-голям цитотоксичен ефект, отколкото би могъл да се очаква при адитивно взаимодействие между двете вещества ($P < 0,01$). Също и при клетъчна линия RPMI-8226 в един от случаите (3 nM Bortezomib + 150 µM Bendamustine) се наблюдава по-голям цитотоксичен ефект от адитивния ($P < 0,01$). В останалите случаи при трите клетъчни линии се наблюдават адитивни ефекти.

В обобщение на получените данни за цитотоксичност върху миеломни клетки *in vitro* може да се каже следното:

- Еруфозинът е ефективен противомиеломен агент, който може синергистично да потенцира действието на необичайния алкилатор Bendamustine, както и на протеазомния инхибитор Bortezomib.
- Растителният пигмент куркумин показва концентрационно зависима противомиеломна активност, като при едновременно приложение с Bendamustine, Melphalan или Bortezomib предизвиква потенциране на противотуморния им ефект.
- Самостоятелното приложение на Bendamustine не се отличава с висока цитотоксична ефективност, вероятно поради липса на описаните *in vivo* активни метаболити.

1.2. Антимиграционен ефект на еруфозина

Първоначално бяха проведени експерименти за установяване на оптимални параметри на миграционния тест за трите миеломни клетъчни линии. Беше установено, че RPMI-8226 са по-склонни да преминават през мембраната в сравнение с другите два

Фиг. IV.27. Комбинирана цитотоксичност на Bortezomib и Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след едновременно третиране с Bortezomib и Bendamustine. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо нетретираната контрола, приета за 100%. Бледожълтите стълбчета изобразяват експериментално получени резултати, а кафявите стълбчета – очаквани стойности при наличие на адитивен ефект. Показани са и съответните стандартни отклонения.

Легенда:

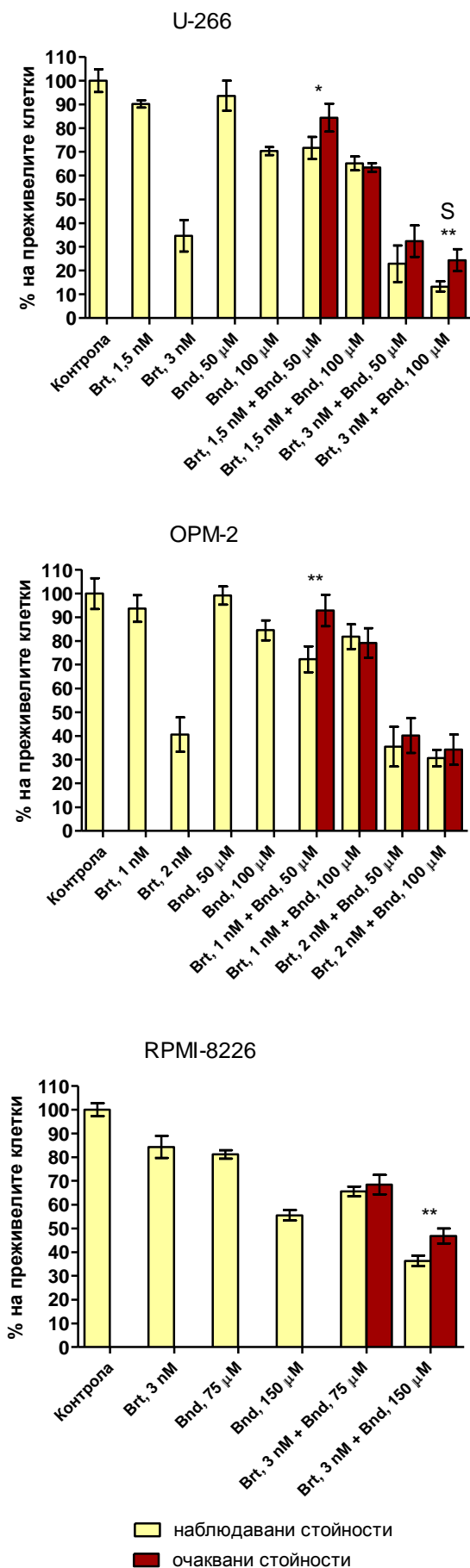
Brt – Bortezomib;

Bnd – Bendamustine;

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 ($SF_{A+B(набл.)}$);

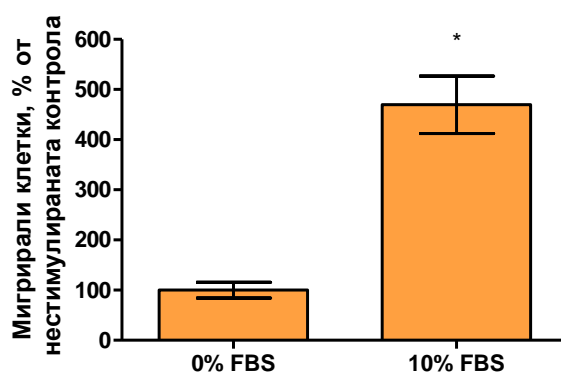
S – синергистично потенциране на цитотоксичния ефект ($SF_{A+B(набл.)} \leq 0,7 \times SF_{A+B(оч.)}$).



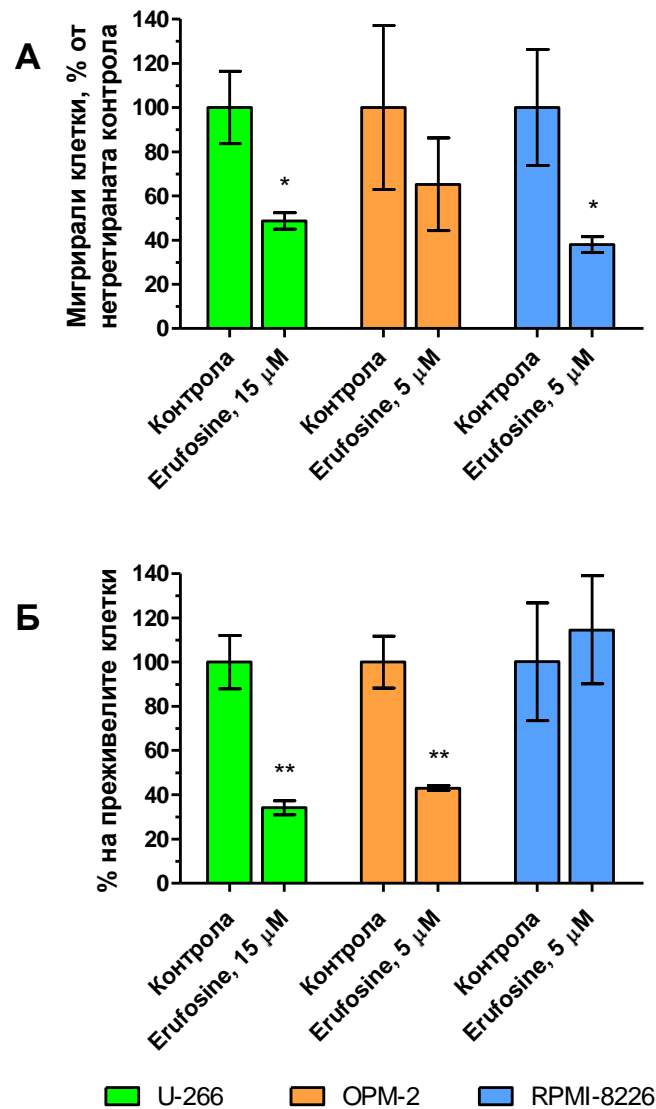
вида клетки и като оптимална гъстота на клетъчната суспензия се възприе $0,5 \cdot 10^6$ кл./ml за клетки U-266 и OPM-2 и $0,25 \cdot 10^6$ кл./ml за клетки RPMI-8226. Бяха изпробвани различни концентрации на FBS и беше установено, че максималният му ефект върху хемотаксиса на клетките се проявява при концентрация 10%. На фиг. IV.28. е показан стимулиращият ефект на серума върху миграцията на клетки OPM-2. Вижда се, че при наличие на 10% FBS в долния компартимент на миграционната постановка, през мембраната преминават 4,7 пъти повече клетки ($P < 0,05$).

След като оптималните параметри бяха уточнени, беше проведено самото изследване на влиянието на Erufosine върху миграционната активност на миеломните клетки. Бяха подбрани сравнително ниски концентрации на еруфозин, за които беше предположено, че няма да окажат пряк цитотоксичен ефект върху клетките. OPM-2 и RPMI-8226 бяха третирани с 5 μ M Erufosine, а U-266 – с 15 μ M Erufosine. Получените резултати са представени на фиг. IV.29.A. Броят на мигриралите третирани клетки U-266 е с 51,3% по-малък от този на мигриралите нетретирани клетки ($P < 0,05$). При RPMI-8226, след третиране с еруфозин, се отчита намаление на мигриралите клетки със 62% ($P < 0,05$). При OPM-2 също се отчита намаление (34,7%), но резултатът не е статистически значим.

Паралелно беше оценена преживяемостта на немигриралите клетки. Получените резултати са представени на фиг. IV.29.B. Вижда се, че еруфозинът не оказва цитотоксичен ефект върху клетки RPMI-8226 в приложената концентрация. Преживяемостта на клетки U-266 и OPM-2 обаче е съотв. 34,1% и 43% от съответната нетретирана контрола ($P < 0,01$).



Фиг. IV.28. Стимулиране на миграцията на клетки OPM-2 при наличие на фетален телешки серум (FBS) в долния компартимент на миграционната постановка. Преди провеждане на миграционния експеримент, клетките са отглеждани в безсерумна среда Opti-MEM® I в продължение на 24 часа. Относителният брой на мигриралите за 12 часа клетки е определен флуорометрично, след оцветяването им с багрилото CellTiter-Blue®. Звездичката обозначава наличието на статистически значима разлика спрямо нетретираната контрола ($P < 0,05$).



Фиг. IV.29. А. Потискане на миграционната активност на миеломни клетки U-266 (зелено), OPM-2 (оранжево) и RPMI-8226 (синьо) след третиране с Erufosine. Преди провеждане на миграционния експеримент, клетките са отглеждани в без-серумна среда Opti-MEM® I в продължение на 24 часа, последните 5 от които в присъствието на еруфозин. Долният компартимент на миграционната постановка е обогатен с фетален телешки серум (10%). Относителният брой на мигриралите за 12 часа клетки е определен флуорометрично, след оцветяването им с багрилото CellTiter-Blue®. Броят на мигриралите клетки в нетретирани контролни групи е приет за 100%. **Б.** Преживяемост на клетките, останали в горния компартимент на миграционната постановка след изтичане на времето за миграция.

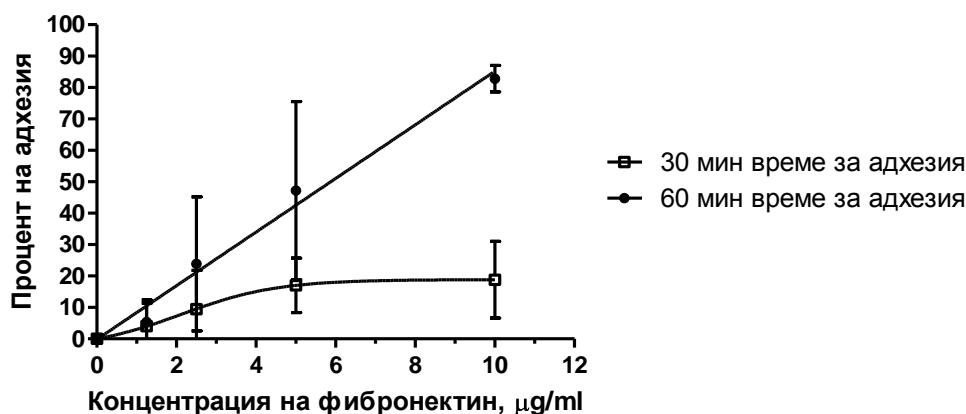
За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана контрола. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

1.3. Инхибиране на адхезионната способност

1.3.1. Инхибиране на адхезията към адсорбирани адхезионни молекули

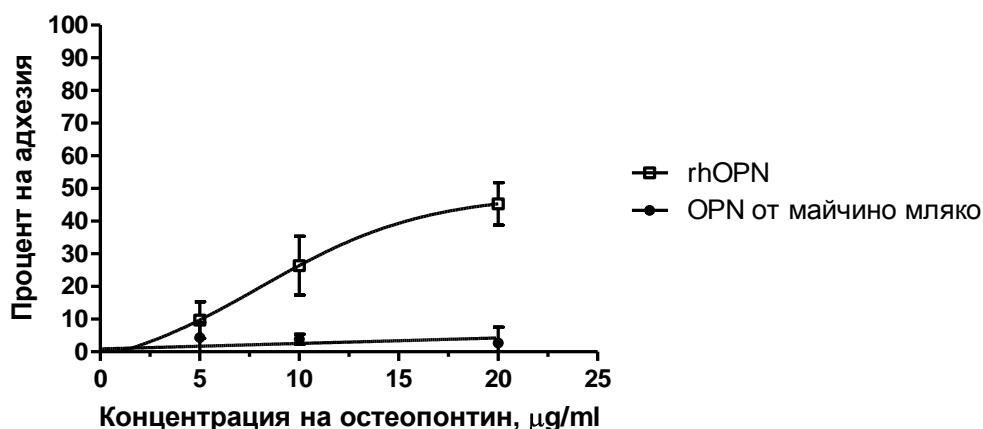
Първоначално бяха проведени експерименти за установяване на оптимални параметри на адхезионния тест за трите миеломни клетъчни линии. За покриване на плаките бяха използвани разтвори на фибронектин с различна концентрация – от 1,25 до 10 $\mu\text{g/ml}$. Бяха изпробвани и две различни времена за адхезия на клетките към покритите плаки – 30 и 60 мин. Установи се, че 30 мин са твърде кратко време, но при 60 минути време за адхезия се получават оптимални резултати с клетки RPMI-8226 (фиг. IV.30). Графиката показва наличие на правопрпорционална линейна зависимост между концентрацията на фибронектиновия разтвор, използван за покриване на плаката, и процента на адхезия. При 10 $\mu\text{g/ml}$ се отчитат 82,8% адхезия. Адхезията при 5 $\mu\text{g/ml}$ обаче е задоволителна (около 47%) и именно тази концентрация беше избрана за следващите експерименти, с оглед на по-рационалното използване на фибронектина. Установи се също, че клетките от другите две линии почти не се прилепват към фибронектина, поради което следващите опити бяха провеждани само с клетъчна линия RPMI-8226.

Бяха потърсени оптималните условия за адхезия на този вид клетки и към остеопонтин. Бяха използвани два различни вида остеопонтин – рекомбинантно получен (rhOPN) и изолиран от майчино мляко. И двата вида остеопонтин бяха използвани в три



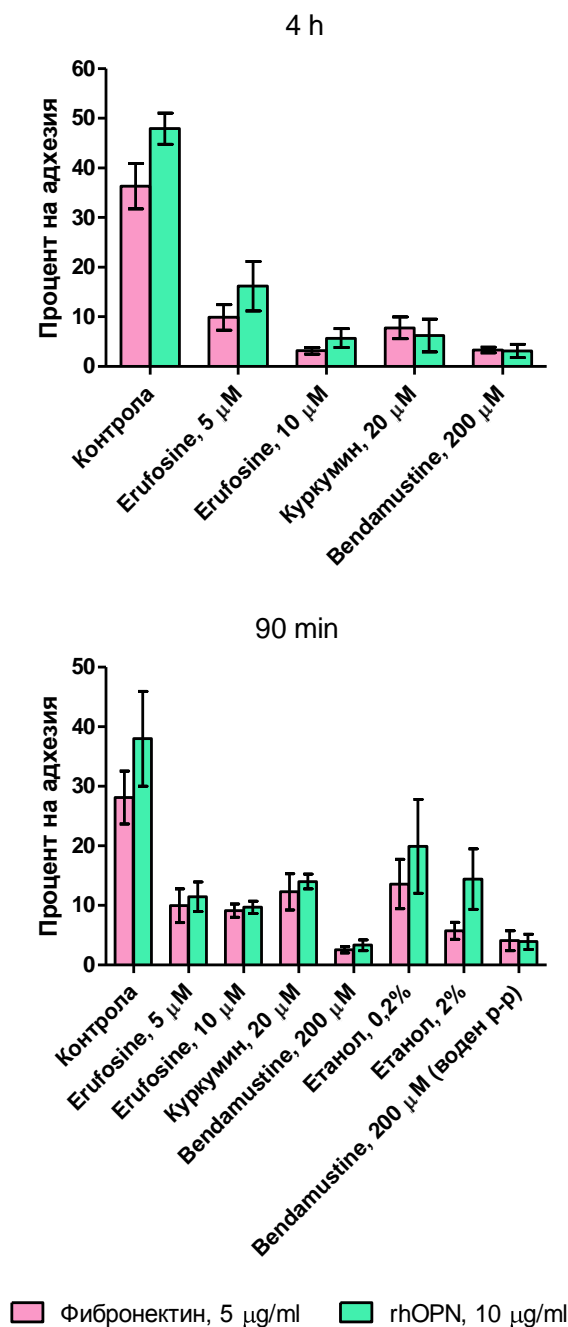
Фиг. IV.30. Адхезия на клетки RPMI-8226 към полистиренова плака, покрита със слой от човешки фибронектин. Покриването на плаката е осъществено чрез обработка с фибронектинови разтвори с концентрации, указани на графиката. Изследвани са две различни времена на контакт на клетките с така приготвената плака – 30 и 60 мин. Представените проценти на адхезия са отнесени спрямо измерената адхезия при контролна група клетки, които са фиксирани с глутаралдехид върху необработена полистиренова повърхност. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

различни концентрации – 5, 10 и 20 $\mu\text{g/ml}$. Получените резултати са представени на фиг. IV.31. Вижда се, че остеопонтинът, изолиран от майчино мляко, не показва добри резултати. При прилагане на rhOPN се наблюдава правопрпорционална зависимост между концентрацията на разтвора, използван за покриване на плаката, и процента на адхезия на клетките. При 20 $\mu\text{g/ml}$ се отчитат 45,3% адхезия, този резултат обаче не е в линейната част на кривата. Затова за следващите експерименти беше избрано покриването на плаките да се извършва с разтвор на rhOPN с концентрация 10 $\mu\text{g/ml}$, осигуряващ около 26% адхезия.



Фиг. IV.31. Адхезия на клетки RPMI-8226 към полистиренова плака покрита със слой от човешки остеопонтин (OPN) – рекомбинантен (rhOPN) или изолиран от майчино мляко. Покриването на плаката е осъществено чрез обработка със съответни остеопонтинови разтвори с концентрации, указани на графиката. Използваното време на контакт на клетките с така приготвената плака е 60 мин. Представените проценти на адхезия са отнесени спрямо измерената адхезия при контролна група клетки, които са фиксирани с глутаралдехид върху необработена полистиренова повърхност. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

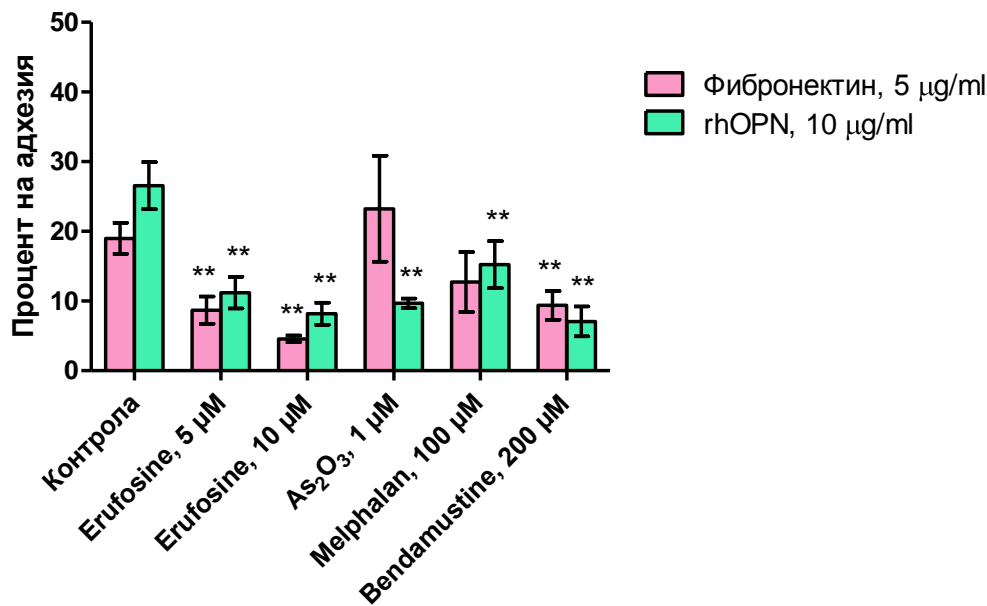
След като оптималните параметри бяха уточнени, беше проведено самото изследване на влиянието на различни вещества (еруфозин, куркумин и бендамустин) върху способността на миеломни клетки RPMI-8226 за адхезия към фибронектин и остеопонтин. Използваните концентрации бяха 5 и 10 μM еруфозин, 10 μM куркумин и 200 μM бендамустин. Получените резултати са представени на фиг. IV.32. Първоначално клетките бяха изложени на въздействието на избраните вещества за период от 4 часа (горната графика). Вижда се, че всички изследвани вещества предизвикват силно понижаване на процента на адхезия на клетките, както към фибронектин, така и към остеопонтин. За да се изключи пряк цитотоксичен ефект като причина за наблюдаваното потискане на



Фиг. IV.32. Влияние на различни вещества върху способността на клетки RPMI-8226 за адхезия към полистиренова плака покрита със слой от човешки фибронектин или остеопонтин (rhOPN). Покриването на плаката е осъществено чрез обработка с разтвори на съответните протеини. Клетките са изложени на въздействието на етанолни разтвори на изследваните вещества за 4 часа (горната графика) или 90 минути (долната графика), след което са приведени в контакт с приготвената плака за 60 мин. Представените проценти на адхезия са отнесени спрямо измерената адхезия при контролна група клетки, които са фиксирани с глутаралдехид върху необработена полистиренова повърхност. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Налице са статистически значими разлики ($P < 0,05$) между данните за нетретираните контроли и данните за коя да е от съответните проби от третирани клетки.

адхезията, експозицията към веществата беше намалена на 90 мин (долната графика). В този случай бяха изследвани и контроли от клетки, третирани само с етанол в концентрации, съответстващи на тези, на които се излагат клетките при третиране с алкохолни разтвори на куркумин и бендамустин – съответно 0,2% и 2%. Това беше направено с цел да се провери дали наблюдаваното потискане на адхезията всъщност не се дължи евентуално на разтворителя. Резултатите показват силно понижаване на процента на адхезия на клетките, не само под действие на разтворите на изследваните вещества, но и от самостоятелно приложен етанол.

Ето защо, накрая експериментът бе проведен при използване на водни разтвори на изследваните вещества. Бяха приложени Erufosine, Bendamustine, Melphalan и As₂O₃, но не и куркумин, поради невъзможността да бъде разтворен във вода. Получените резултати са представени на фиг. IV.33. Вижда се, че в използваните концентрации еруфозинът и бендамустинът понижават степента на адхезия на клетки RPMI-8226 към фибро-



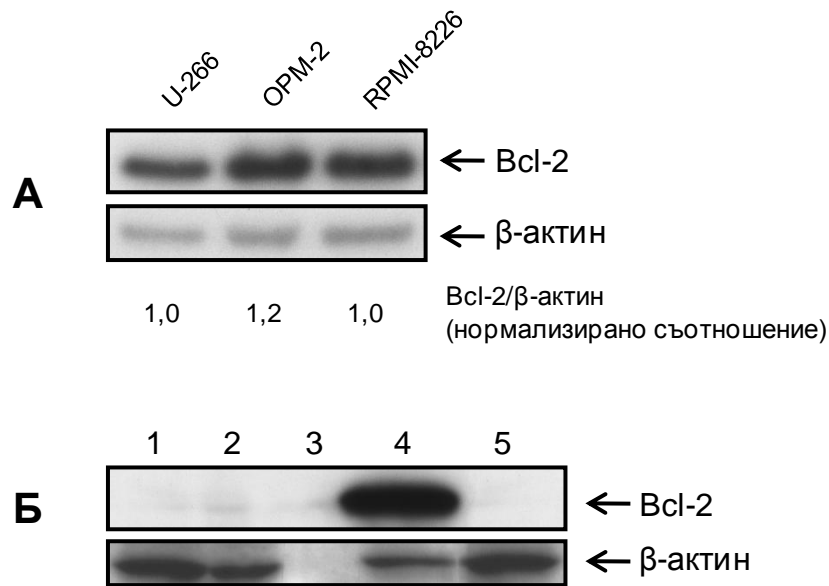
Фиг. IV.33. Влияние на различни вещества върху способността на клетки RPMI-8226 за адхезия към полистиренова плака покрита със слой от човешки фибронектин или остеопонтин (rhOPN). Покриването на плаката е осъществено чрез обработка с разтвори на съответните протеини. Клетките са изложени на въздействието на водни разтвори на изследваните вещества за 90 минути, след което са приведени в контакт с приготвената плака за 60 мин. Представените проценти на адхезия са отнесени спрямо измерената адхезия при контролна група клетки, които са фиксирани с глутаралдехид върху необработена полистиренова повърхност. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана контрола ($P < 0,01$).

нектин ($P < 0,01$). Понижението след третиране с 5 μM Erufosine, 10 μM Erufosine или 200 μM Bendamustine е съответно с 54,2%, 75,8% или 50,5% спрямо нетретираната контрола. Освен това, всички изследвани вещества в използваните концентрации понижават степента на адхезия на клетките към остеопонтин ($P < 0,01$). Понижението след третиране с 5 μM Erufosine, 10 μM Erufosine, 1 μM As_2O_3 , 100 μM Melphalan или 200 μM Bendamustine е съответно с 57,9%, 69,2%, 63,5%, 42,9% или 73,3% спрямо нетретираната контрола.

1.3.2. Разработване на модел за изучаване на адхезията на миеломни клетки към остеобластни клетки SAOS-2

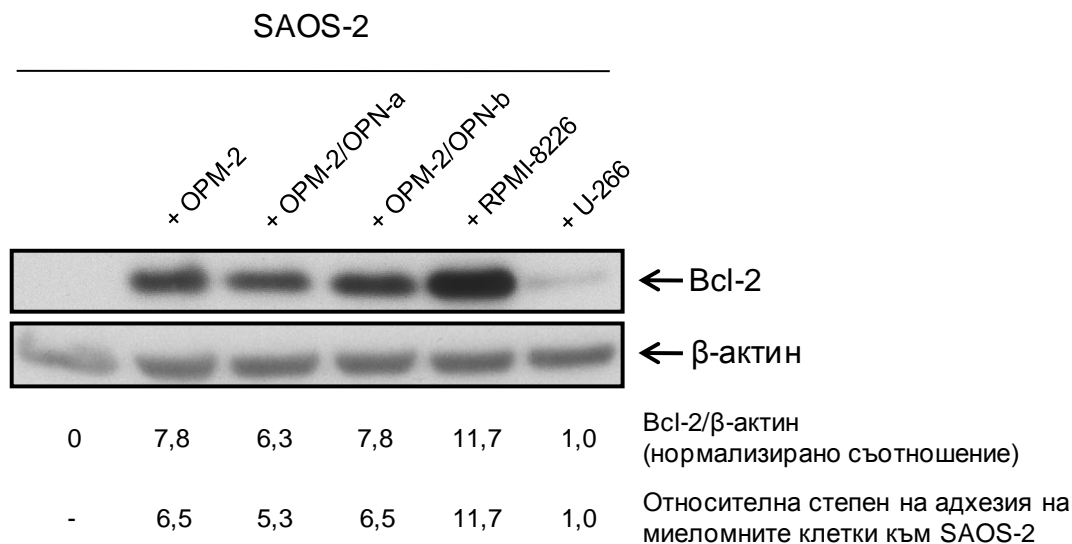
Първоначално беше потърсен протеин, който да се експресира в голямо количество от всички миеломни клетки, но да не се експресира от SAOS-2. Такъв беше намерен в лицето на антиапоптоичния протеин Bcl-2. Резултатите от проведените имуноблотове са представени на фиг. IV.34. От горния чифт блотове се вижда, че и трите миеломни клетъчни линии експресират Bcl-2, при това в сходна степен – U-266 и RPMI-8226 имат едно и също съотношение Bcl-2/ β -актин, а при OPM-2 то е само 1,2 пъти по-високо. Долният чифт блотове позволява да се направи сравнение между нивата на Bcl-2 в стандартно отглеждани клетки U-266 и SAOS-2, както и в клетки SAOS-2, които са били изложени на действието на разтворими фактори, секретирани от U-266. Вижда се, че миеломните клетки имат висока степен на експресия на този протеин, докато при SAOS-2 тя е пренебрежимо ниска или нулева и не се увеличава след контакт на клетките с кондиционирана среда от U-266. Допълнителна контрола показва отсъствието на Bcl-2 в самата кондиционирана среда.

Беше направен опит разкритата възможност за отдиференциране на двата типа клетки чрез имуноблот за Bcl-2 да се използва за откриване на присъствието и относителното количество на миеломни клетки, адхерирани към монослой от остеобластни клетки SAOS-2. Успешността на този подход се демонстрира от резултатите, представени на фиг. IV.35. На показания имуноблот се виждат липсата на Bcl-2 в контролния монослой от клетки SAOS-2 и големите количества на протеина в монослоеве от клетки SAOS-2, които в продължение на 24 часа са били в контакт с миеломни клетки RPMI-8226 или OPM-2, или пък със стабилно трансфектираните производни на OPM-2 (OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b). Макар и в малко количество, Bcl-2 се открива и в монослоя от SAOS-



Фиг. IV.34. Имуноблотове, показващи експресията на антиапоптотичния протеин Bcl-2 при миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226 (А) и в следните проби (Б): 1 – туморно-трансформирани остеобласти SAOS-2; 2 – SAOS-2, отглеждани в продължение на 48 часа съвместно с клетки U-266, но физически разделени от тях чрез мембрана с пори от 0,4 μm; 3 – кондиционирана среда от U-266; 4 – U-266; 5 - SAOS-2, отглеждани в кондиционирана среда от U-266. За контрол на равномерността на нанасяне на пробите са показани и нивата на убиквитерния протеин β-актин. Числовите съотношения са получени от денситометрично определените интензитети на съответните бандове, като съотношението при клетки U-266 е прието за единица и останалите са приравнени спрямо него.

2, който е бил в контакт с миеломни клетки U-266. В групата с клетки RPMI-8226 се отчита 11,7 пъти повече Bcl-2, отколкото в групата с U-266. Тъй като тези два вида миеломни клетки имат еднакво ниво на експресия на Bcl-2, може да се направи изводът, че RPMI-8226 имат 11,7 пъти по-голям афинитет от U-266 да адхерират към SAOS-2. В групите с клетки OPM-2, OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b се отчитат съответно 7,8, 6,3 и 7,8 пъти повече Bcl-2, отколкото в групата с U-266. Като се вземе предвид, че OPM-2 и производните им имат 1,2 пъти повече Bcl-2 от U-266, може да се изчисли, че OPM-2, OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b имат съответно 6,5, 5,3 и 6,5 пъти по-голям афинитет от U-266 да адхерират към SAOS-2.

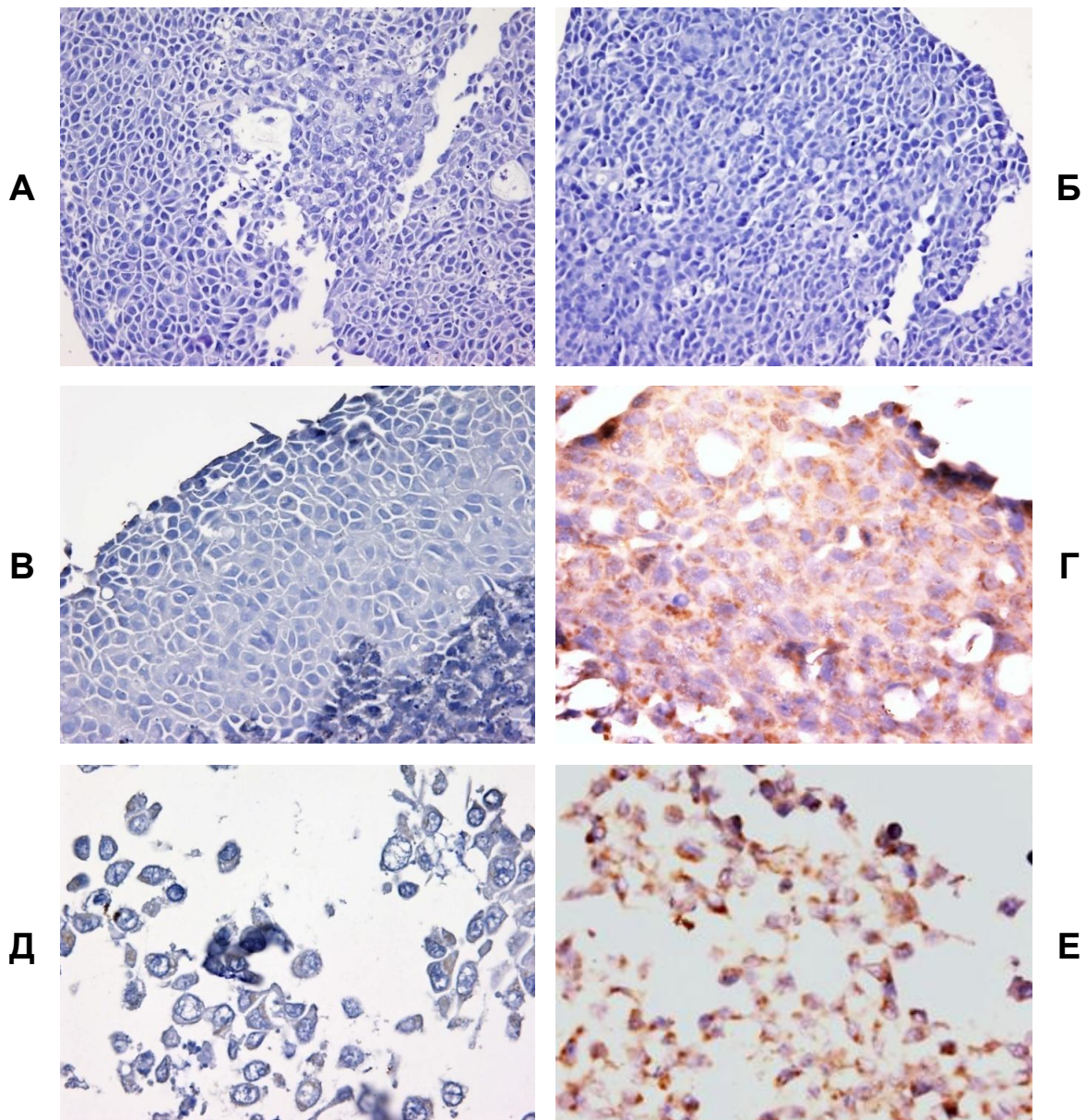


Фиг. IV.35. Относителна степен на адхезия на миеломни клетки към туморно-трансформирани остеобласти SAOS-2. Монослоеве от клетки SAOS-2 са инкубирани в продължение на 24 часа с различни видове миеломни клетки. След изхвърляне на надстоящата течност, адхерентните клетъчни слоеве са промити двукратно с фосфатен буфер и анализирани чрез имуноблот за съдържание на Bcl-2 и β-актин. Съотношенията Bcl-2/β-актин са получени от денситометрично определените интензитети на съответните бандове и са приравнени спрямо резултата за клетки U-266, приет за единица. Получените стойности за пробите с различни видове клетки OPM-2 са разделени на фактор 1,2, за да се компенсира за по-високото ниво на Bcl-2 в тези клетки, отколкото в RPMI-8226 или U-266. Крайният резултат представлява сравнителна количествена характеристика на афинитета на миеломните клетки към SAOS-2.

1.4. Разработване на *in vitro* модел за изучаване на костната инвазия на миеломните клетки

Сфероиди от остеобластни клетки SAOS-2 бяха култивирани съвместно с миеломни клетки във въртящ се биореактор, създаващ условия на микрогравитация. Фактът, че миеломните клетъчни линии експресират Bcl-2, а SAOS-2 – не, беше използван за имунохистохимично отдиференциране на двата типа клетки в хистологични препарати от сфероидите. На фиг. IV.36. са представени получените резултати от имунохистохимичното оцветяване на препарати от два сфероида – контролен, получен при самостоятелно култивиране на клетки SAOS-2 (снимки А, В и Д) и смесен, получен при съвместно култивиране с миеломни клетки U-266 (снимки Б, Г и Е). На снимки А и Б са показани срезове, оцветени само с хематоксилин-еозин. На останалите снимки са показани срезове, оцветени едновременно с хематоксилин-еозин (син цвят) и с маркирано антитяло

срещу Vcl-2 (оранжево-кафяв цвят). На снимки В и Д липсват оранжево-кафяво оцветени клетки (U-266), а на снимки Г и Е такива има и при това са проникнали сред останалите изцяло сини клетки (SAOS-2). На снимката с по-голямо увеличение (Е) се виждат двойки от свързани една с друга клетки от двата различни типа. Тези данни свидетелстват, че при съвместно култивиране миеломните клетки U-266 проникват сред остеобластните SAOS-2 и се свързват с тях.



Фиг. IV.36. Срезове на контролен сфероид от клетки SAOS-2 (А, В и Д) и на сфероид от SAOS-2, култивиран съвместно с миеломни клетки U-266 в продължение на 48 часа (Б, Г и Е). Всички срезове са оцветени с хематоксилин-еозин, а срезове В, Г, Д и Е са подложени и на имунохистохимична обработка с антитяло срещу Vcl-2. На снимки Г и Е се вижда, че миеломните клетки, оцветени в оранжево-кафяво поради съдържанието си на Vcl-2, са навлезли сред остеобластните.

2. Механизъм на действие на изследваните вещества

2.1. Индуциране на апоптоза

2.1.1. Промени в морфологията на клетъчните ядра

Миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226 бяха третирани с различни концентрации бендамустин и еруфозин, за различни периоди от време. След това от клетките бяха приготвени микроскопски препарати, като ядрата бяха оцветени с DAPI.

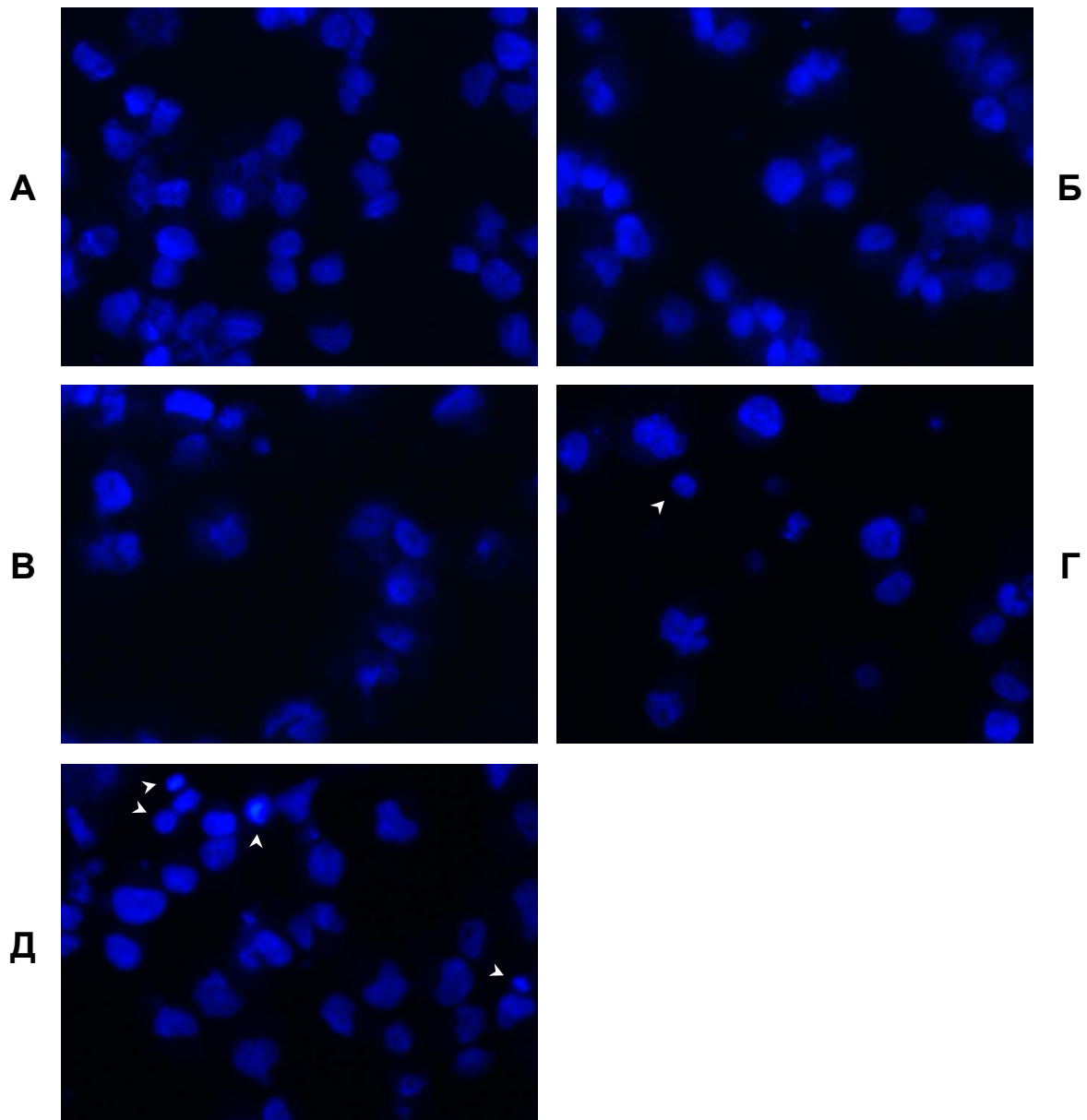
На фиг. IV.37. са показани снимки на препарати от клетки U-266. Не се наблюдават промени в ядрата на клетките, третирани с Erufosine (20 или 40 μM) в продължение на 48 часа (снимки Б и В). В препаратите от клетки, третирани с Bendamustine (50 или 100 μM), обаче се наблюдава кариопикноза – свиване и уплътняване (кондензация) на ядрата (снимки Г и Д). Тези промени са по-силно изразени при клетките, третирани с по-високата концентрация бендамустин.

На фиг. IV.38. са показани снимки на препарати от клетки OPM-2. В препаратите от клетки, третирани с 15 μM Erufosine за 16 или 24 часа (снимки Б и В), се наблюдават кариопикноза и кариорексис (фрагментация на ядрата). Промените са по-силно изразени на 24-ия час. В препаратите от клетки, третирани с 50 μM Bendamustine за 48 часа, не се установяват видими промени (снимка Г), но в тези, третирани със 100 μM Bendamustine, е налице кариопикноза (снимка Д).

На фиг. IV.39. са показани снимки на препарати от клетки RPMI-8226. Не се наблюдават промени в ядрата на клетките, третирани с 15 μM Erufosine за период от 14 часа (снимка Б). В препаратите от клетки, третирани със същата концентрация еруфозин, но за 24 или 48 часа (снимки В и Г), се наблюдава кариопикноза. Промените са по-силно изразени на 48-ия час.

2.1.2. Нарастване на процентния дял на суб-G1-фракцията (частта от клетки със съдържание на ДНК по-малко от характерното за фаза G1)

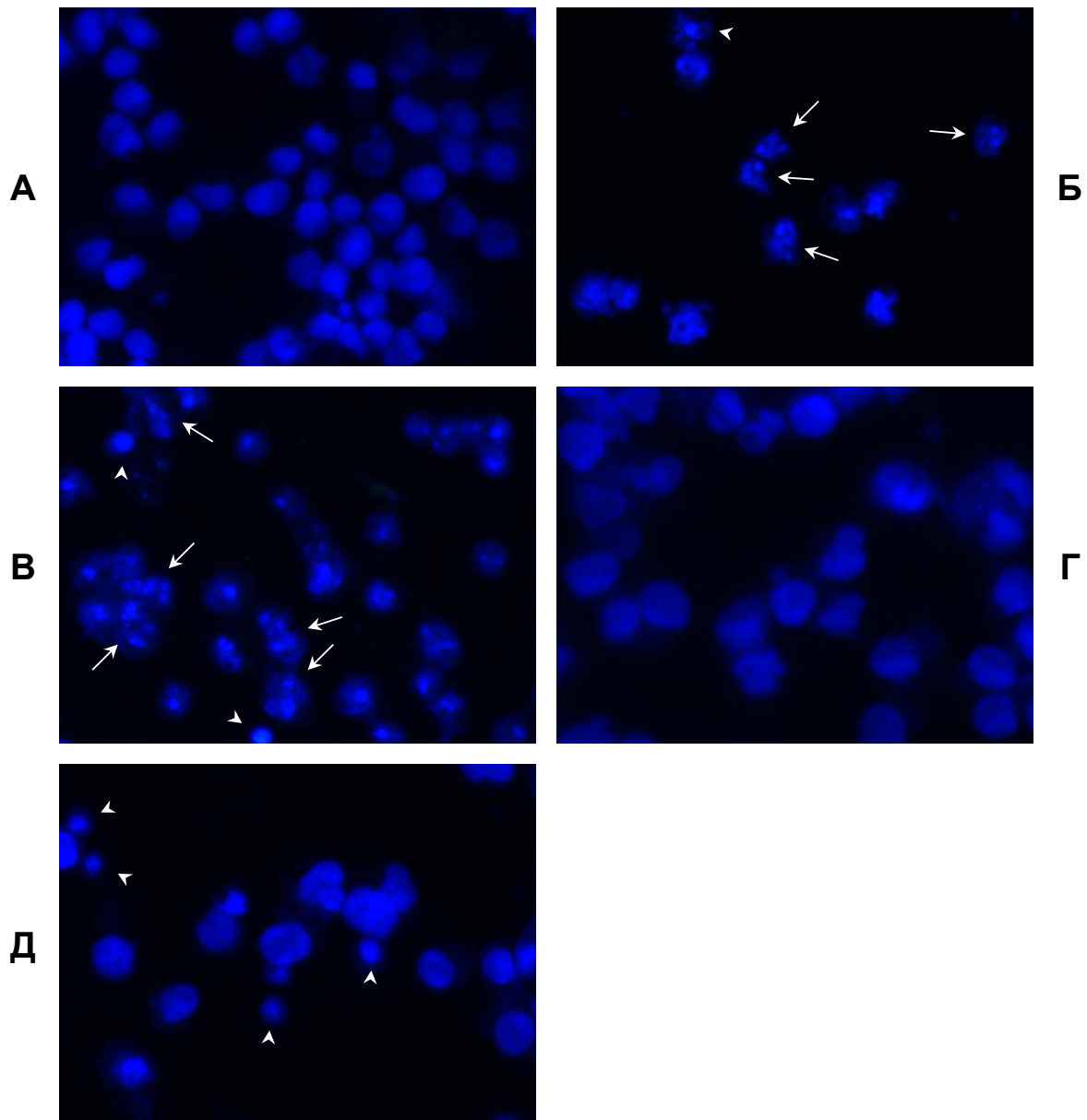
Миеломни клетки U-266 и OPM-2 бяха третирани за период от 24 часа с еруфозин, куркумин или диарсенов триоксид в ефективни цитотоксични концентрации. След това



Фиг. IV.37. Клетъчни ядра от миеломни клетки U-266, оцветени с DAPI. А – нетретирани клетки; Б – третирани с 20 μM Erufosine за 48 часа; В – третирани с 40 μM Erufosine за 48 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).

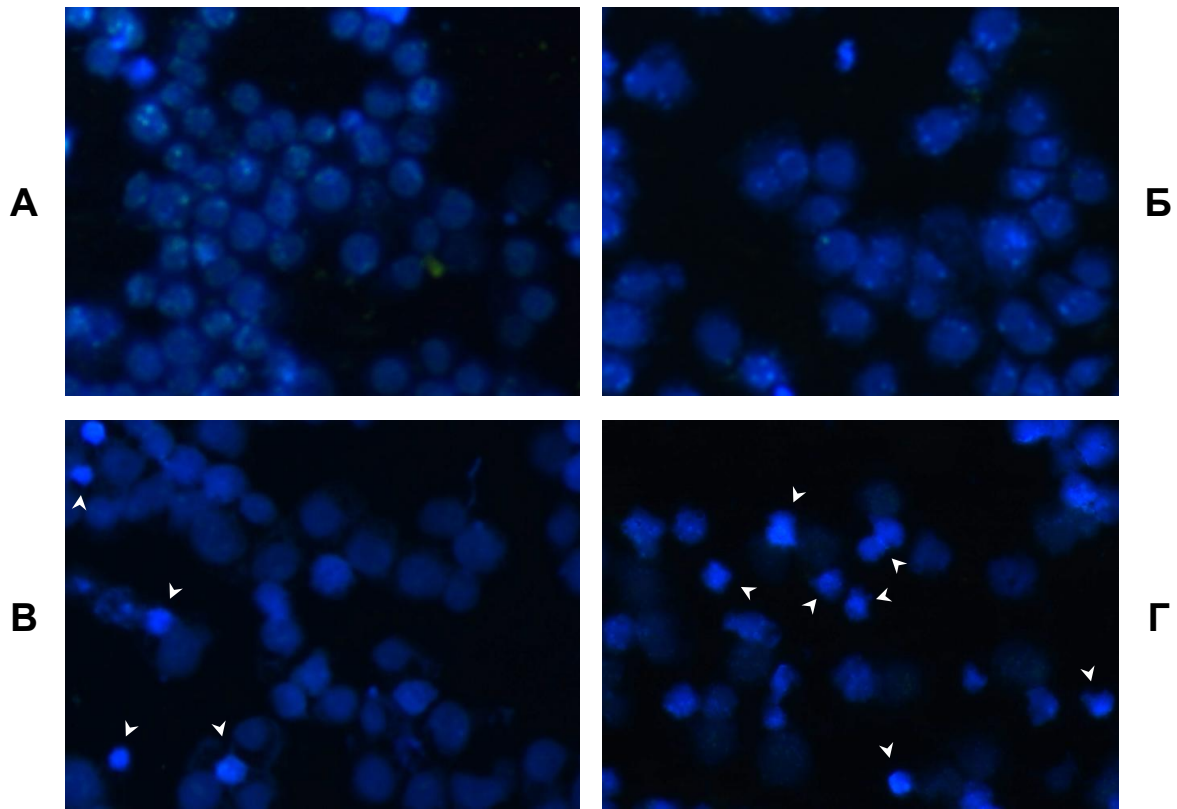
клетките бяха обработени с разтвор на пропидиев йодид и ДНК-съдържанието им беше анализирано чрез поточна цитометрия по Nicoletti.

На фиг. IV.40. са представени получените резултати за клетките, третирани с Erufosine. При клетки U-266 процентният дял на суб-G1-фракцията нараства незначително от 2,74% (нетретирана контрола) на 3,78% (20 μM еруфозин) или 4,3% (30 μM еруфозин). При клетки ОРМ-2 обаче се наблюдава повишение от 7,86% (нетретирана контрола) на 19,18% (10 μM еруфозин).



Фиг. IV.38. 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).

На фиг. IV.41. са представени резултатите от третиране на миеломни клетки с куркумин. При клетки U-266 процентният дял на суб-G1-фракцията нараства от 2,74% (нетретирана контрола) на 7,26% (20 μM куркумин) или 18,78% (30 μM куркумин). При клетки ОРМ-2 процентният дял на суб-G1-фракцията нараства от 7,86% (нетретирана контрола) на 11,43% (10 μM куркумин).

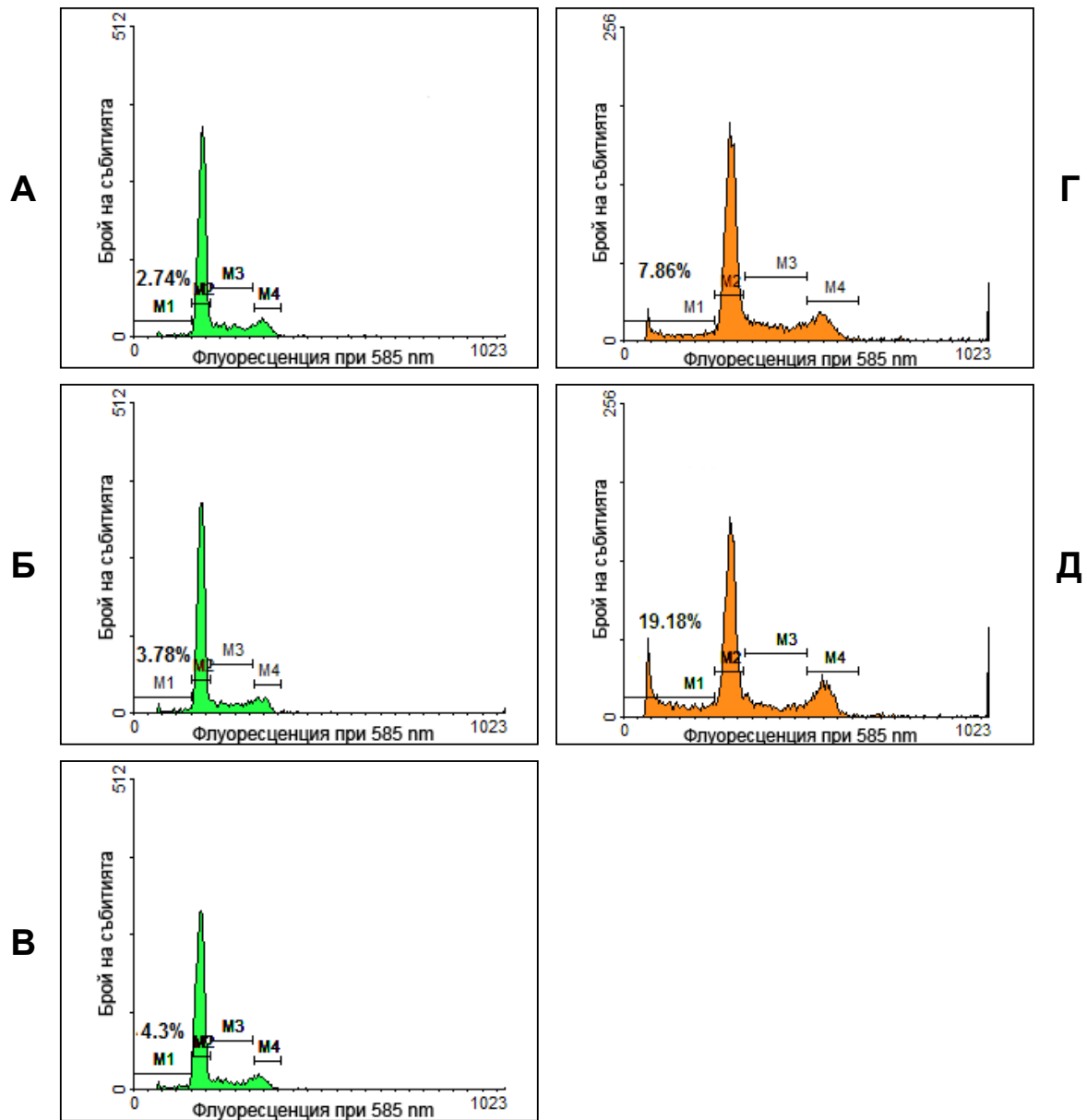


Фиг. IV.39. Клетъчни ядра от миеломни клетки RPMI-8226, оцветени с DAPI. А – нетретирани клетки; Б – третирани с 15 μM Erufosine за 14 часа; В – третирани с 15 μM Erufosine за 24 часа; Г – третирани с 15 μM Erufosine за 48 часа; върхове на стрелки – кариопикноза (свиване и уплътняване на ядрата).

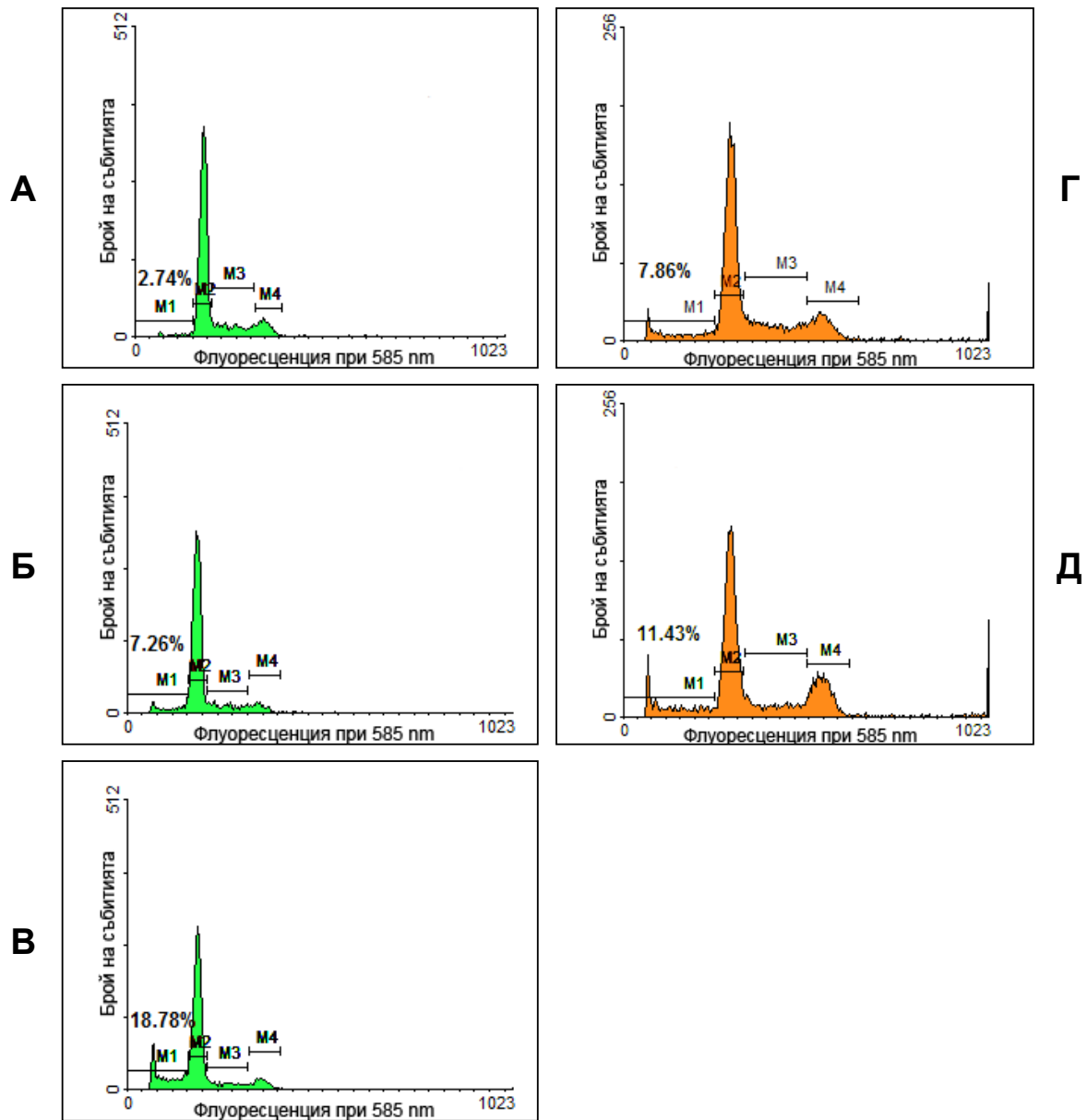
На фиг. IV.42. са представени получените резултати за клетките, третирани с диарсенов триоксид. При клетки U-266 процентният дял на суб-G1-фракцията нараства от 2,74% (нетретирана контрола) на 4,5% (0,5 μM As_2O_3) или 8,37% (4 μM As_2O_3). При клетки OPM-2 процентният дял на суб-G1-фракцията нараства от 7,86% (нетретирана контрола) на 9,71% (0,5 μM As_2O_3) или 15,27% (2 μM As_2O_3).

2.1.3. Олигонуклеозомна ДНК-фрагментация

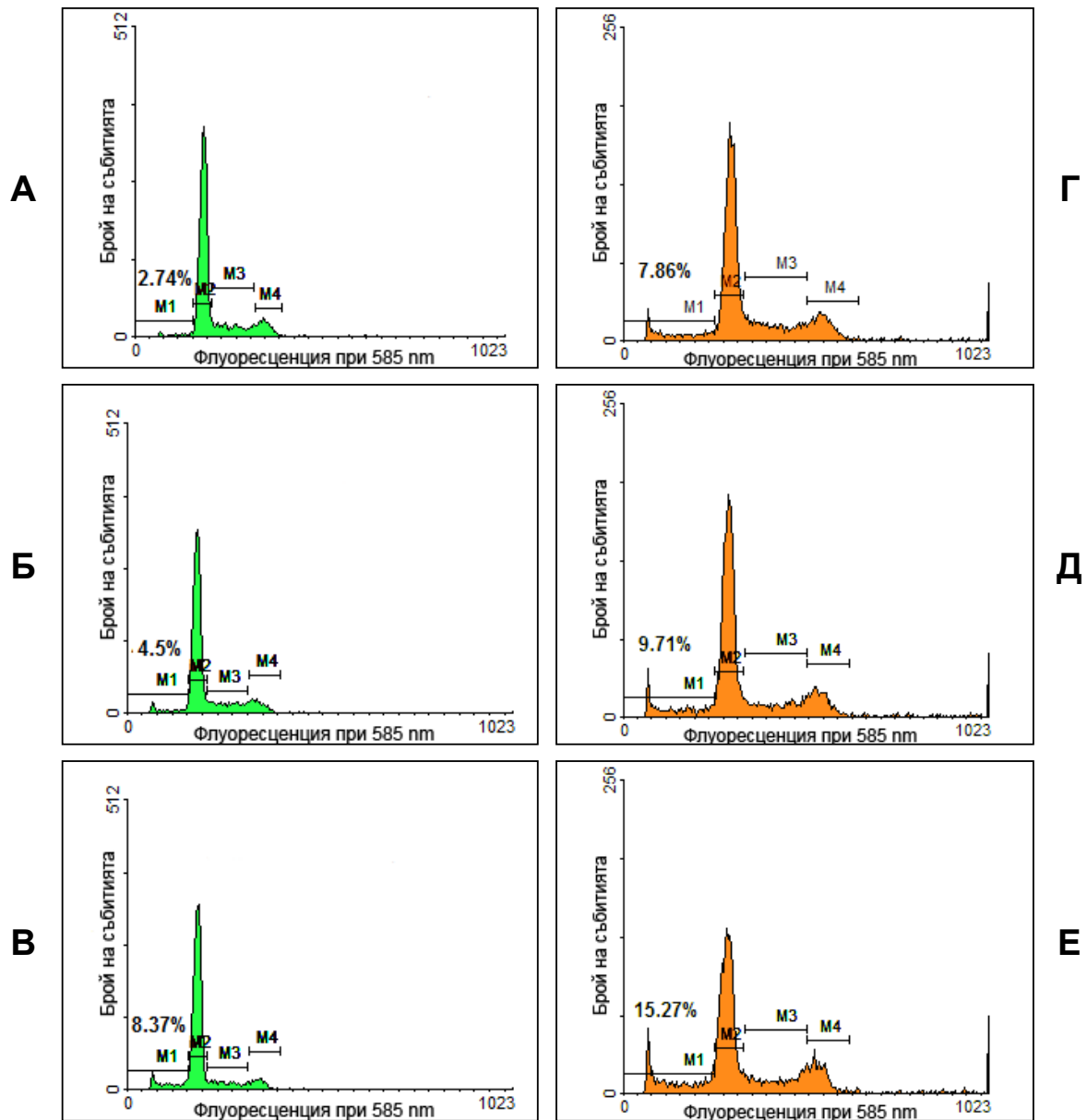
Миеломни клетки U-266 и RPMI-8226 бяха третирани за период от 24 часа с бендамустин, еруфозин или бортезомиб в ефективни цитотоксични концентрации. След това от цитозола на клетките беше изолирана ДНК, която беше подложена на електрофореза в агарозен гел. Не беше наблюдавано образуване на „стълбица” от ДНК-фрагменти (признак за олигонуклеозомна ДНК-фрагментация и апоптоза) в нито една от пробите. Резултатите за клетъчна линия U-266 са представени на фиг. IV.43.A.



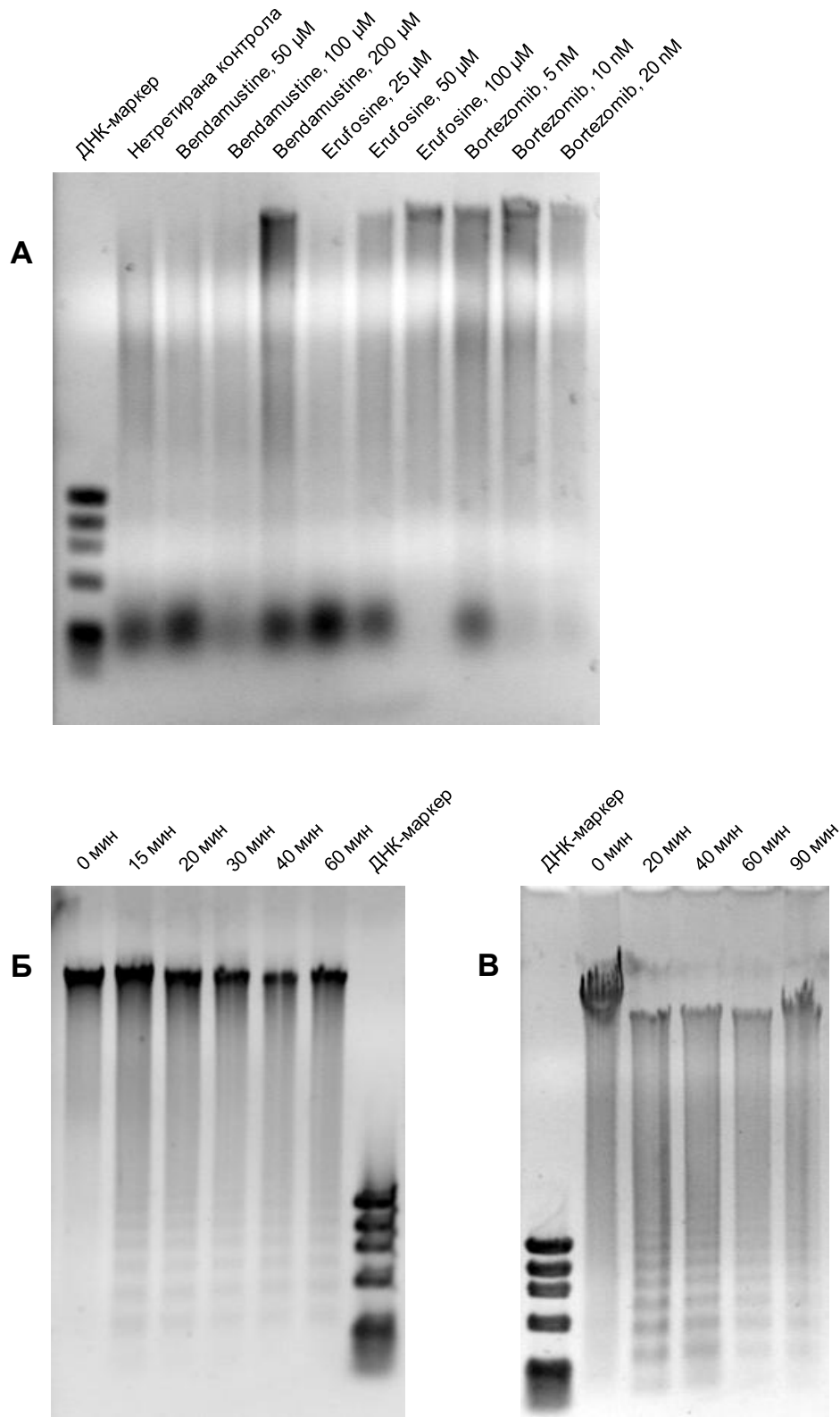
Фиг. IV.40. Резултати от поточно-цитометрично изследване по Nicoletti на способността на Erufosine да предизвиква апоптоза при миеломни клетки. А – нетретирани U-266; Б – U-266, третирани с 20 μM Erufosine за 24 часа; В – U-266, третирани с 30 μM Erufosine за 24 часа; Г – нетретирани OPM-2; Д – OPM-2, третирани с 10 μM Erufosine за 24 часа. Означения: M1 – суб-G1-фракция; M2 – клетки в G1-фазата на клетъчния цикъл; M3 – клетки в S-фазата на клетъчния цикъл; M4 – клетки в G2-фазата на клетъчния цикъл. Към всяка хистограма е даден съответният процентен дял на суб-G1-фракцията.



Фиг. IV.41. Резултати от поточно-цитометрично изследване по Nicoletti на способността на куркумина да предизвиква апоптоза при миеломни клетки. А – нетретирани U-266; Б – U-266, третирани с 20 μ M куркумин за 24 часа; В – U-266, третирани с 30 μ M куркумин за 24 часа; Г – нетретирани ОРМ-2; Д – ОРМ-2, третирани с 10 μ M куркумин 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.



Фиг. IV.42. Резултати от поточно-цитометрично изследване по Nicoletti на способността на диарсеновия триоксид да предизвиква апоптоза при миеломни клетки. А – нетретирани U-266; Б – U-266, третирани с 0,5 μM As_2O_3 за 24 часа; В – U-266, третирани с 4 μM As_2O_3 за 24 часа; Г – нетретирани OPM-2; Д – OPM-2, третирани с 0,5 μM As_2O_3 за 24 часа; Е – OPM-2, третирани с 2 μM As_2O_3 за 24 часа. Означения: M1 – суб-G1-фракция; M2 – клетки в G1-фазата на клетъчния цикъл; M3 – клетки в S-фазата на клетъчния цикъл; M4 – клетки в G2-фазата на клетъчния цикъл. Към всяка хистограма е даден съответният процентен дял на суб-G1-фракцията.



Фиг. IV.43. Резултати от гел-електрофореза на ДНК, изолирана от: А – цитозола на клетки U-266, третирана с различни вещества за 24 часа; Б и В – ядра на клетки U-266 или съотв. RPMI-8226, след инкубиране на ядрата с цитозолен екстракт от клетки SKW-3 (KE-37), предварително третирана с еруфозин (20 μM) за 24 часа. Над снимки Б и В е обозначено времето на инкубация на отделните проби.

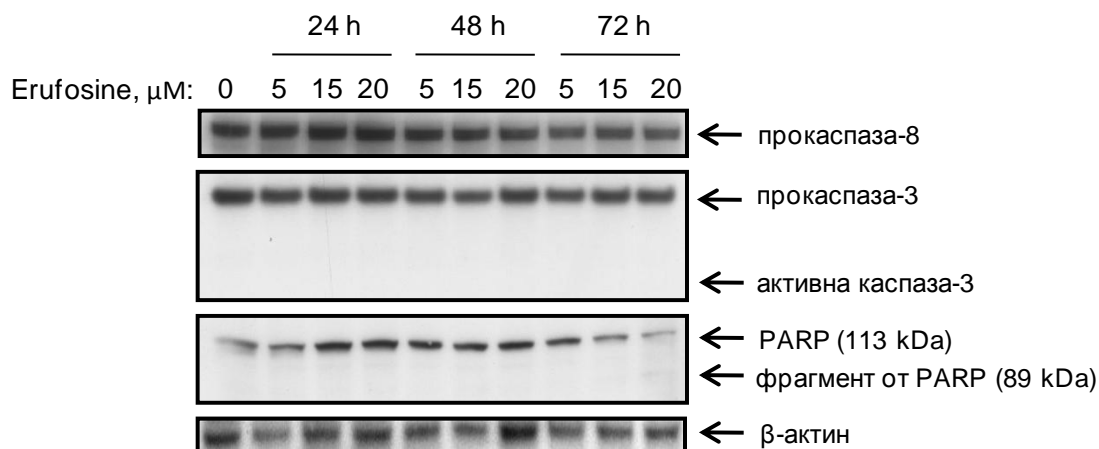
Беше проведен допълнителен експеримент, за да се докаже податливостта на ядра от клетки U-266 и RPMI-8226 към олигонуклеозомна ДНК-фрагментация. Ядрата бяха отделени от клетките и бяха инкубирани с цитозолен екстракт от клетки SKW-3 (KE-37), предварително третирани с еруфозин (20 μM) за 24 часа. (Тези клетки са много чувствителни към еруфозин и реагират с активиране на апоптотичните каскади.) Резултатите от електрофореза на ДНК, изолирана от тези ядра, са представени на фиг. IV.43.Б. и В., съответно за ядра от клетки U-266 или RPMI-8226. Вижда се липсата на олигонуклеозомна ДНК-фрагментация в контролните неинкубирани ядра и наличието на такава в ядрата, инкубирани с цитозолен екстракт от клетки SKW-3. Фрагментацията се наблюдава при всички приложени времена на инкубация (от 15 до 60 мин при ядра от U-266 и от 20 до 90 мин при ядра от RPMI-8226).

2.1.4. Активиране на апоптотичните каскади

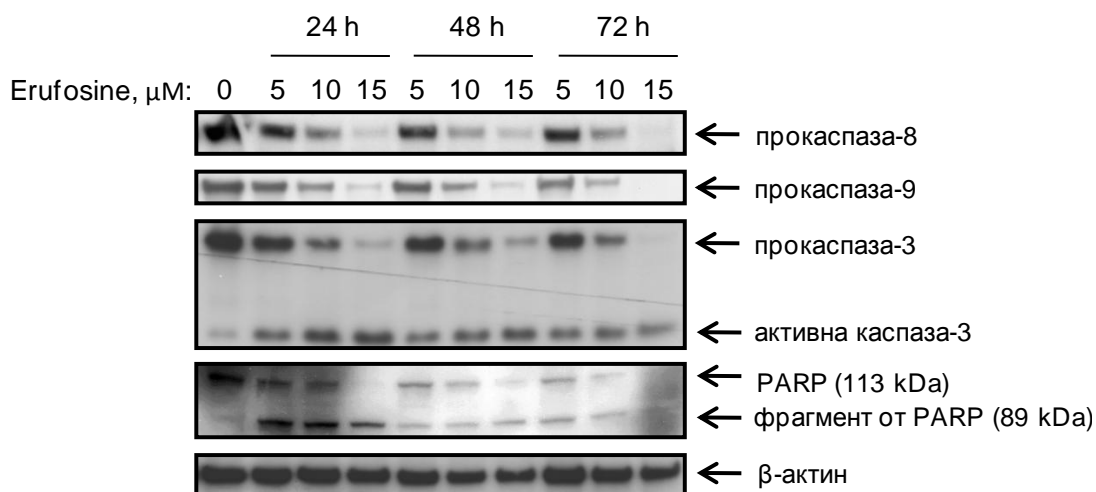
Клетки U-266 бяха третирани с Erufosine (5, 15 или 20 μM) за различни периоди от време (24, 48 или 72 часа), след което бяха изследвани чрез имуноблот за промени в нивата и активационния статус на различни каспази, както и на репарационния ензим поли(АДФ-рибоза)-полимераза (PARP). Получените резултати са представени на фиг. IV.44. В никоя от пробите не се забелязват промени в нивата на неактивните прокаспази-8 и -3 или поява на активните им фрагменти. Фрагментирани и инактивирани на PARP се наблюдава единствено в клетките, третирани с 20 μM еруфозин за 72 часа, но е много слабо изразено.

Аналогичен експеримент беше проведен с клетки OPM-2, но с по ниски концентрации на еруфозин – 5, 10 и 15 μM . Получените резултати са представени на фиг. IV.45. Наблюдава се активиране на основните инициаторни прокаспази (прокаспаза-8 и прокаспаза-9, ключови съответно във външния или вътрешния път на апоптозата), активиране на основната ефекторна каспаза (каспаза-3) и фрагментиране на PARP. Описаните промени са концентрационно-зависими и настъпват още на 24-ия час от въздействието с еруфозин. Вижда се, че още при 5 μM еруфозинът предизвиква понижаване в нивото на неактивните прокаспази-8, -9 и -3. Използваното антитяло срещу прокаспаза-3 „улавя“ и активната форма, което позволява да се види как паралелно с понижаването на нивото на неактивната прокаспаза-3 се повишава нивото на активната каспаза-3. Успоредно с активирането на каспаза-3 настъпва протеолитично разцепване на нейния

субстрат PARP, с получаване на характерния за апоптозата фрагмент с молекулна маса 89 kDa.



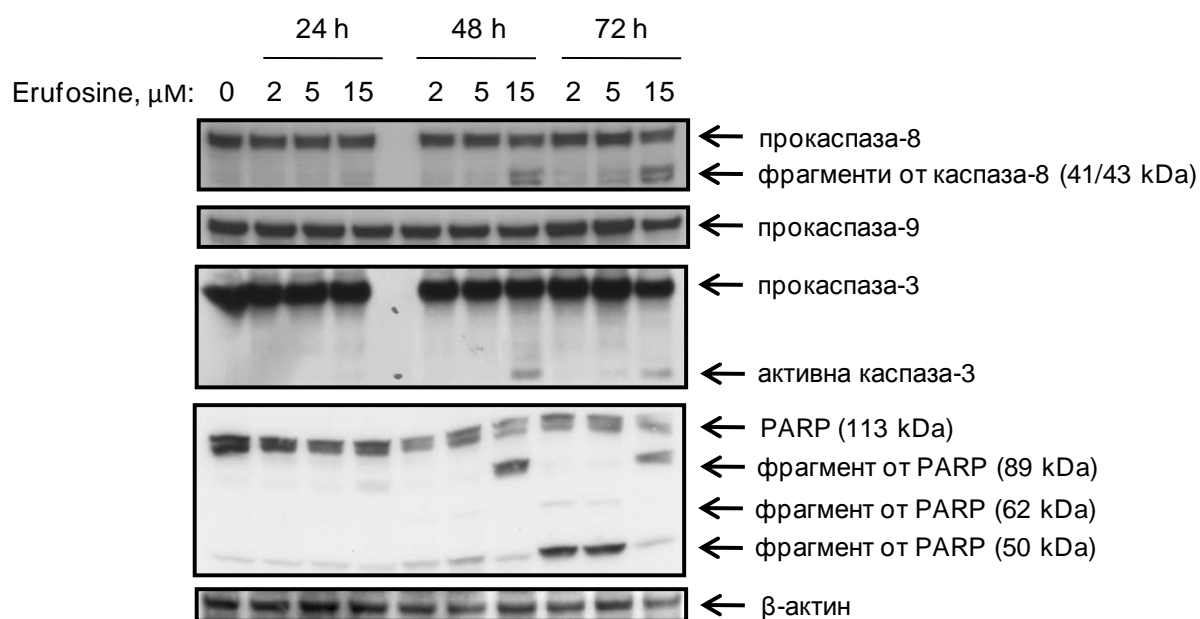
Фиг. IV.44. Липса на въздействие на Erufosine върху апоптотичните каскади в клетки U-266. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 20 μM за период от 24 до 72 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.



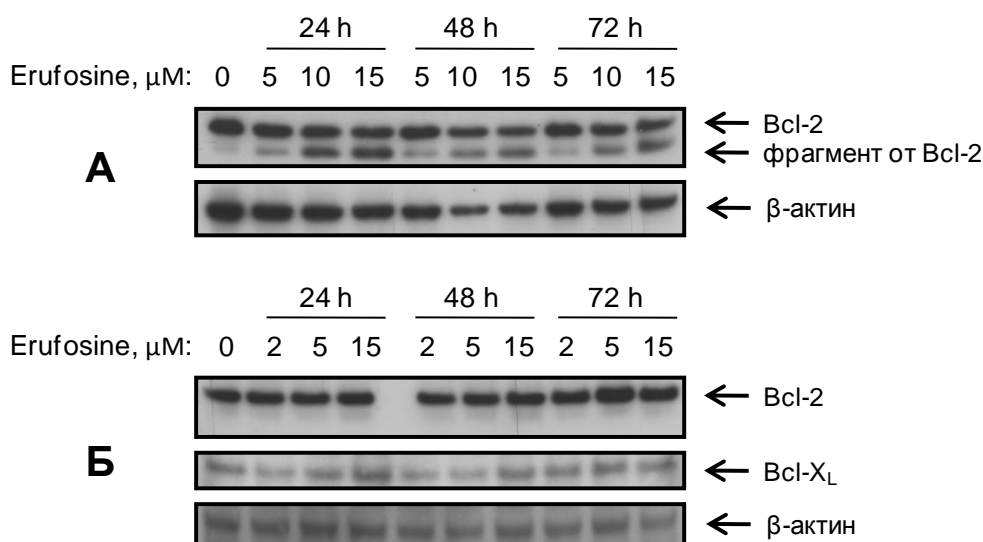
Фиг. IV.45. Концентрационно-зависимо активиране на апоптотичните каскади в клетки OPM-2 след третиране с Erufosine. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 15 μM за период от 24 до 72 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.

При клетъчна линия RPMI-8226 същият експеримент беше проведен с концентрации на еруфозина 2, 5 и 15 μM . Получените резултати са представени на фиг. IV.46. Не се наблюдават промени в нивото на неактивната прокаспаза-9. Забелязва се известно активиране на каспаза-8 и каспаза-3, но само при сравнително висока концентрация на еруфозин (15 μM) и по-дълго време на въздействие (48 или 72 часа). Успоредно с това се наблюдава значително фрагментиране на PARP, с получаване на характерния за апоптозата фрагмент (89 kDa). В пробите от клетки, третирани с по-ниски концентрации Erufosine (2 или 5 μM) за 48 или 72 часа, също настъпва фрагментиране на PARP, но то протича по качествено различен начин с получаване на различни по вид фрагменти (62 и 50 kDa). Те са в ниско количество на 48-ия час и в по-високо на 72-ия час.

Пробите от клетки OPM-2 и RPMI-8226 бяха изследвани и за евентуални промени в нивата на антиапоптотичните протеини Bcl-2 и Bcl-X_L. Получените резултати са представени на фиг. IV.47. При OPM-2 се наблюдава фрагментиране на Bcl-2. Ефектът е концентрационно-зависим и е силно изразен още на 24-ия час след третирането с еруфозин. При клетъчна линия RPMI-8226 не се установява подобно фрагментиране на Bcl-2, нито промени в нивото му. Промени не се наблюдават и по отношение на Bcl-X_L.



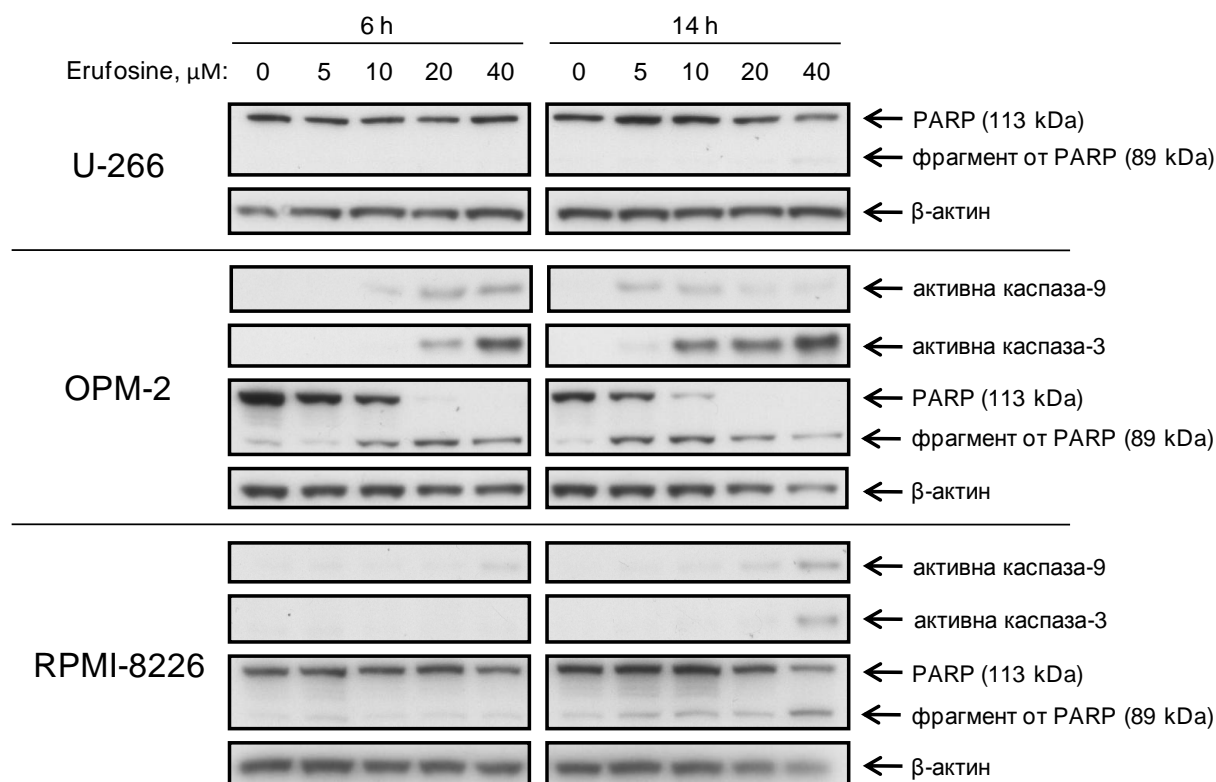
Фиг. IV.46. Въздействие на Erufosine върху апоптотичните каскади в клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 15 μM за период от 24 до 72 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби.



Фиг. IV.47. Еруфозинът индуцира фрагментация на Bcl-2 при клетки OPM-2 (А), но не оказва видимо въздействие върху Bcl-2 и Bcl-X_L при клетки RPMI-8226 (Б). Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 15 μM за период от 24 до 72 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.

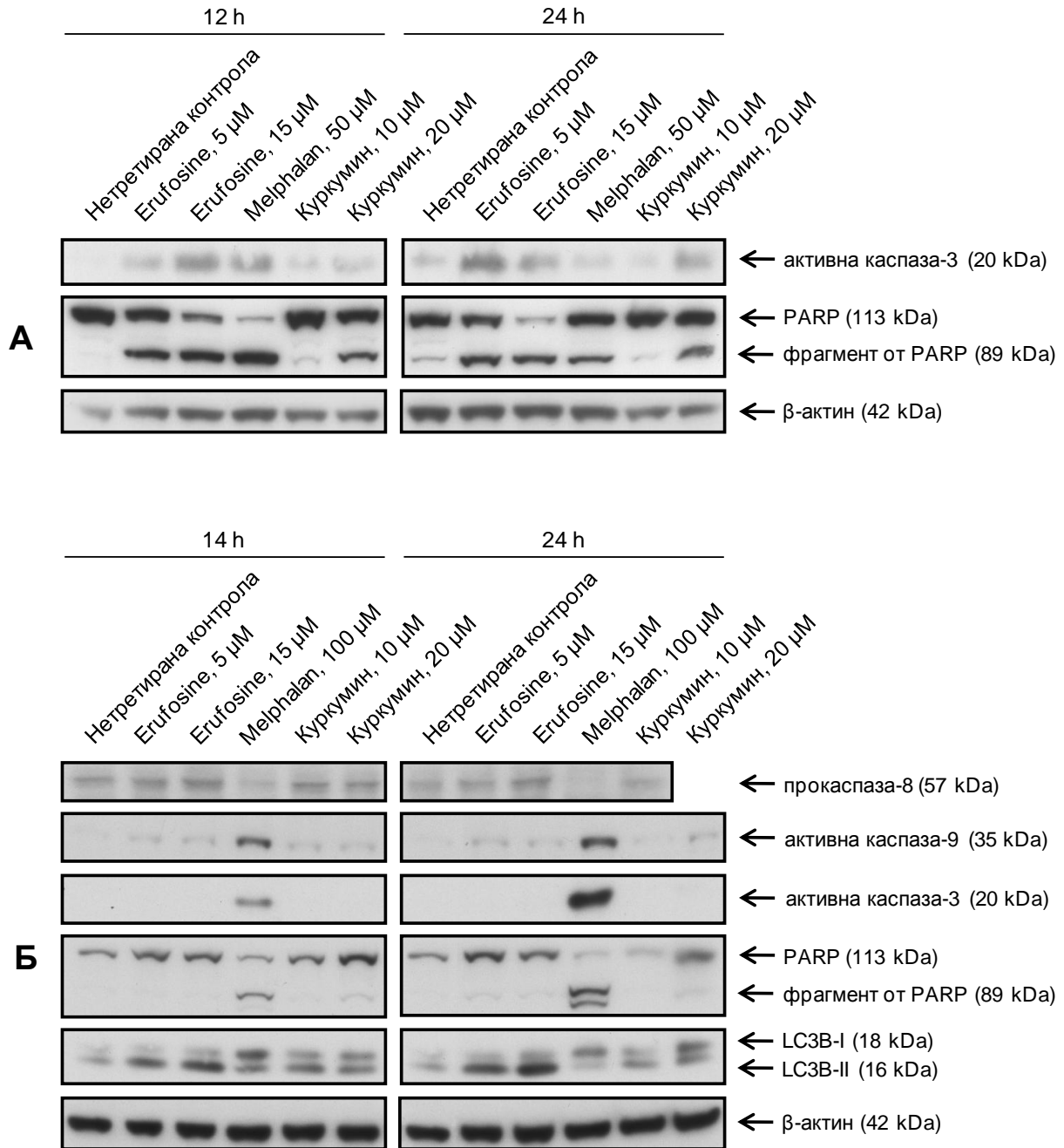
Активирането на апоптотичните каскади беше изследвано и в клетки, третирани с еруфозин за по кратки периоди от време (6 или 14 часа), но с по-високи концентрации, достигащи до 40 μM. В този случай бяха използвани антитела, свързващи се само с активните фрагменти на каспази-9 и -3. Получените резултати са представени на фиг. IV.48. При клетъчна линия U-266 не се наблюдават признаци за индуциране на апоптоза, с изключение на едва забележимо фрагментиране на PARP в клетките, третирани с 40 μM еруфозин за 14 часа. При клетъчна линия OPM-2 се наблюдава концентрационно-зависимо активиране на каспази-9 и -3, съпроводено с фрагментиране на PARP. В клетките, изложени на действието на Erufosine за 6 часа, тези промени настъпват при минимална концентрация 10 μM. В клетките, третирани за 14 часа, промените настъпват при минимална концентрация 5 μM. При клетъчна линия RPMI-8226 каспаза-9 се активира след въздействие с минимум 40 μM Erufosine за 6 часа или минимум 20 μM Erufosine за 14 часа. Активиране на каспаза-3 и фрагментиране на PARP се установява само в клетките, третирани с 40 μM Erufosine за 14 часа.

При друг експеримент, проведен върху клетки OPM-2 и RPMI-8226, беше сравнена степента на активиране на апоптотичните каскади от различни вещества с противомиеломно действие. Клетки OPM-2 бяха третирани в продължение на 12 или 24 часа с еруфозин (5 или 15 μM), мелфалан (50 μM) или куркумин (10 или 20 μM). Получените ре-



Фиг. IV.48. Въздействие на Erufosine върху апоптотичните каскади в миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби.

зултати са представени на фиг. IV.49.A (снимки на блотовете) и на таблица IV.1. (денситометрични данни). Сред 12-часовите проби, с най-високо ниво на активна каспаза-3 се отличават клетките, третирани с 15 μM Erufosine, следвани от третираните с мелфалан. Най-ниско ниво на активна каспаза-3 имат клетките, третирани с куркумин. Във всички третирани проби се наблюдава фрагментиране и инактивиране на PARP. В основни линии то е пропорционално на степента на активиране на каспаза-3 с изключение на това, че най-висока степен на фрагментация се наблюдава в клетките, третирани с Melphalan. Сред 24-часовите проби, с най-високо ниво на активна каспаза-3 се отличават клетките, третирани с 5 μM Erufosine, следвани от третираните с 20 μM куркумин. Най-висока степен на фрагментиране на PARP се наблюдава в клетките, третирани с 15 μM Erufosine, след които последователно се нареждат третираните с 5 μM Erufosine, 50 μM Melphalan, 20 μM куркумин и 10 μM куркумин.



Фиг. IV.49. Въздействие на различни вещества върху апоптотичните каскади в клетки OPM-2 (А) и RPMI-8226 (Б), както и върху процеса на автофагия при клетки RPMI-8226 (Б). Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за различни периоди от време, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Търсено е фрагментиране на каспазите и на PARP като белези за протичане на апоптоза, както и превръщане на LC3B-I в LC3B-II като признак за стимулиране на автофагичния процес. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби.

		12 h				
OPM-2	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 50 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на активна каспаза-3	1,0	2,9	5,4	4,0	1,6	2,4
Дял на неактивния фрагмент на PARP	3,9%	42,5%	64,4%	81,9%	12,0%	33,6%
		24 h				
OPM-2	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 50 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на активна каспаза-3	1,0	3,9	2,1	0,9	0,9	3,7
Дял на неактивния фрагмент на PARP	13,8%	47,2%	72,8%	31,4%	0,5%	27,7%
		14 h				
RPMI-8226	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 100 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на прокаспаза-8	1,0	1,3	1,6	0,4	1,1	0,9
Относително ниво на активна каспаза-9	1,0	3,5	4,3	19,9	4,2	3,9
Относително ниво на активна каспаза-3	0	0	0	+	0	0
Дял на неактивния фрагмент на PARP	3,8%	4,0%	3,9%	57,5%	3,4%	3,8%
Относително ниво на LC3B-II	1,0	2,8	3,6	1,6	2,1	1,8
		24 h				
RPMI-8226	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 100 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на прокаспаза-8	1,0	1,0	1,7	0,5	0,8	-
Относително ниво на активна каспаза-9	1,0	4,6	3,2	24,2	0,9	3,3
Относително ниво на активна каспаза-3	0	0	0	+	0	0
Дял на неактивния фрагмент на PARP	3,8%	5,9%	6,3%	88,4%	0%	2,8%
Относително ниво на LC3B-II	1,0	2,9	3,6	0,8	1,2	1,6

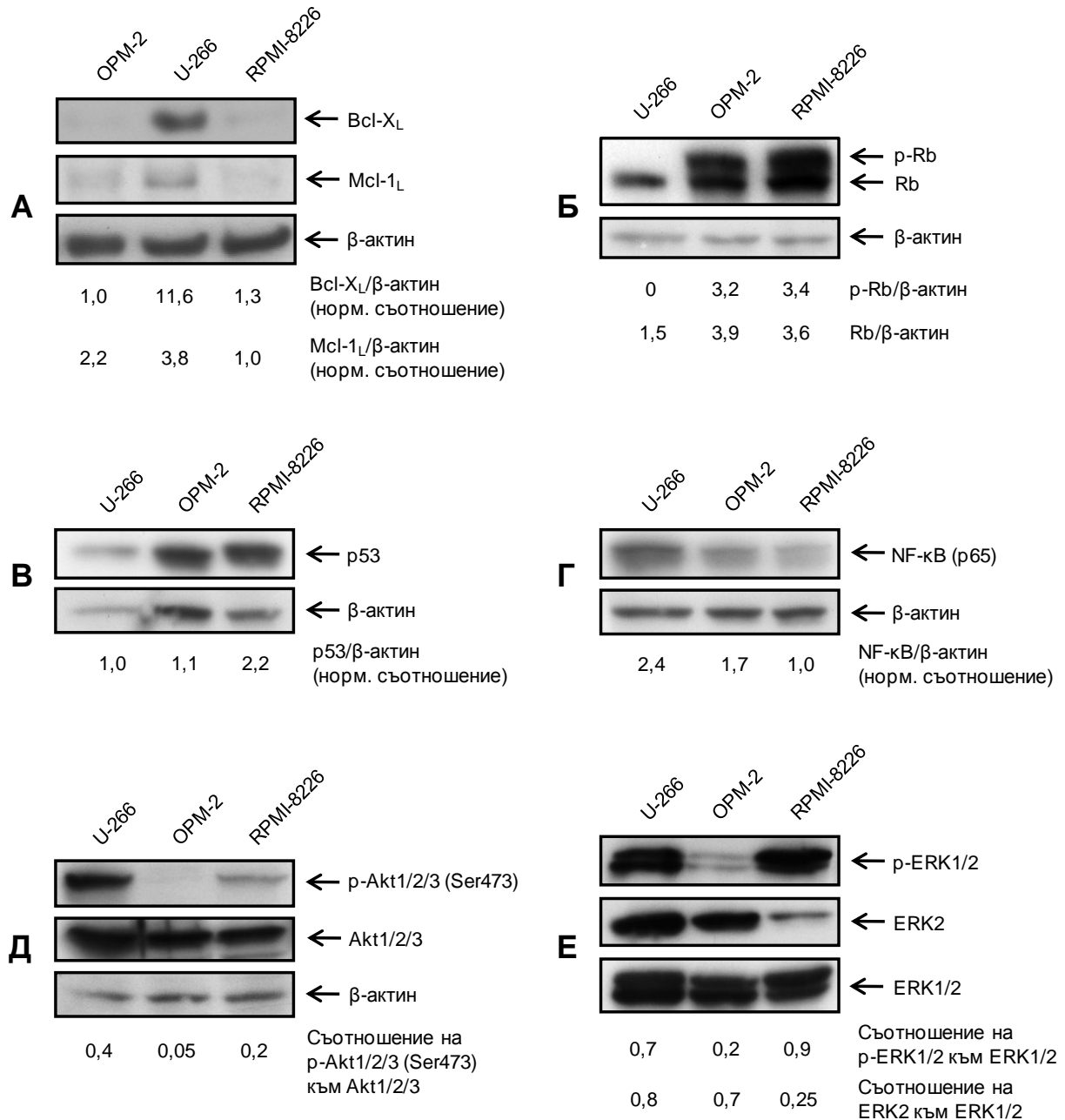
Таблица IV.1. Въздействие на различни вещества върху апоптотичните каскади в клетки OPM-2 и RPMI-8226, както и върху процеса на автофагия при клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за различни периоди от време, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за каспазите и за LC3B-II са разделени на съответните интензитети за контролния протеин β-актин. Получените съотношения при нетретираните контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите. Делът на неактивния фрагмент на PARP е изчислен като процент от общото количество PARP чрез съпоставка на интензитетите на съответните бандове.

Клетки RPMI-8226 бяха третирани в продължение на 14 или 24 часа с еруфозин (5 или 15 μM), мелфалан (100 μM) или куркумин (10 или 20 μM). Получените резултати са представени на фиг. IV.49.Б (снимки на блотовете) и на таблица IV.1. (денситометрични данни). Значително активиране на каспази-8, -9 и -3 и инактивиране на PARP се наблюдават единствено в клетките, третирани с Melphalan. Известно повишаване на нивото на неактивния фрагмент на PARP се отчита и при клетките, третирани с 20 μM куркумин. При тази клетъчна линия бяха изследвани и нивата на двете форми на протеина LC3B. Вижда се, че под действие на еруфозина настъпва превръщане на цитозолната форма LC3B-I (18 kDa) в липидно-свързаната LC3B-II (16 kDa) – признак за стимулиране на автофагичния процес. Нивото на LC3B-II нараства 3,6 пъти в клетките, третирани с 15 μM Erufosine. Известно повишение на нивото на LC3B-II се наблюдава и в клетките, третирани с куркумин.

Може да се обобщи, че бяха получени експериментални доказателства за настъпване на физиологична клетъчна смърт (апоптоза) след третиране на миеломни клетки с еруфозин, куркумин или мелфалан – бяха регистрирани характерни за този тип смърт промени като ядрена фрагментация, формиране на суб-G1-фракция, активиране на инициаторните и ефекторни каспази и фрагментация на PARP.

2.2. Промени в сигнално-трансдукционните пътища

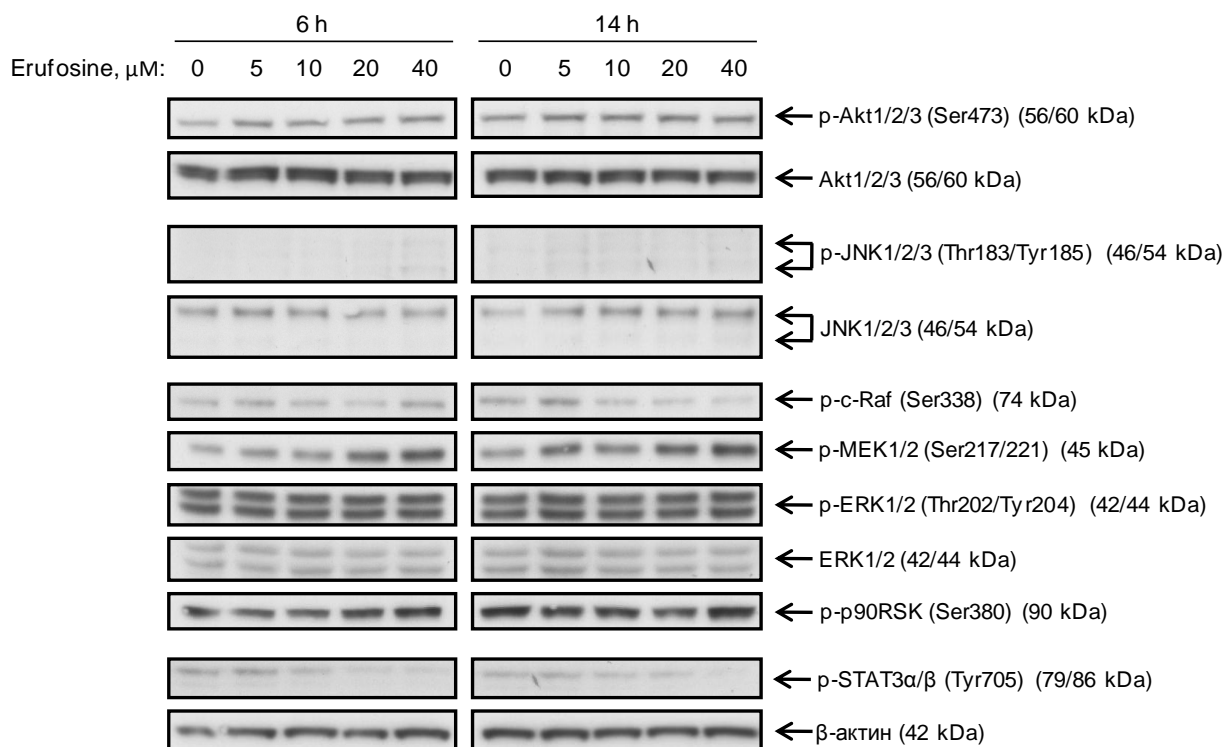
Преди да се изследва влиянието на изучаваните вещества върху сигналната трансдукция в миеломни клетки, беше направена съпоставка на нивата на някои сигнални и регулаторни протеини в нетретирани клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Получените резултати са представени на фиг. IV.50. При клетъчна линия U-266 се наблюдава висока експресия на антиапоптотичните протеини Bcl-X_L и Mcl-1_L. Нивото на Bcl-X_L в тези клетки 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 клетки U-266 е 1,7 пъти по-високо, отколкото в клетки OPM-2, и 3,8 пъти по-високо, отколкото в клетки RPMI-8226. При клетъчните линии OPM-2 и RPMI-8226 се наблюдават два банди за тумор-супресорния протеин Rb (горният от които вероятно отговарящ на неактивната, фосфорилирана форма, а долният – на активната, дефосфорилирана форма), а при U-266 само един – подолния. При това плътността на долния банд при U-266 е по-ниска, отколкото при



Фиг. IV.50. Имуноблотове, сравняващи миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226 по отношение на експресията и в някои случаи степента на фосфорилиране на: антиапоптотичните протеини Bcl-X_L и Mcl-1 (А); тумор-супресорните протеини Rb (Б) и p53 (В); субединицата p65 на транскрипционния фактор NF-κB (Г); киназите Akt (Д) и ERK (Е). За контрол на равномерността на нанасяне на пробите са показани и нивата на убиквитерния протеин β-актин. Числовите съотношения са получени от денситометрично определените интензитети на съответните бандове, като при някои от групите данни най-малкото съотношение е прието за единица и останалите са приравнени спрямо него.

OPM-2 и RPMI-8226. Клетъчните линии U-266 и OPM-2 имат сходни нива на експресия на тумор-супресорния протеин p53, докато при RPMI-8226 нивото е около 2 пъти по-високо. Наблюдава се нарастване на нивото на субединицата p65 на транскрипционния фактор NF-κB в реда RPMI-8226 < OPM-2 < U-266. При клетъчна линия U-266 изоформите на киназата Akt (Akt1/2/3) в много голяма степен са фосфорилирани при Ser473 и следователно са активни, докато при OPM-2 много малка част от наличния Akt е фосфорилиран при Ser473. RPMI-8226 заема междинно положение в това отношение. Изоформите на киназата ERK (ERK1/2) са фосфорилирани в сравнително ниска степен при OPM-2 и във висока степен при останалите две клетъчни линии, особено RPMI-8226. Вижда се, че относителният дял на изоформата ERK2 е около 3 пъти по-малък при RPMI-8226, отколкото при другите две клетъчни линии.

Клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226 бяха третирани с Erufosine в концентрации от 5 до 40 μM за 6 или 14 часа, след което бяха изследвани чрез имуноблот за промени в нивата и активационния статус на протеини от сигналните пътища PI3K/Akt, JNK/c-Jun, Ras/Raf/MEK/ERK и JAK/STAT. Получените резултати за клетъчна линия U-266 са представени на фиг. IV.51. (снимки на блотовете) и на таблица IV.2. (денситометрични данни). В никоя от пробите не се наблюдават значителни промени в нивата и степента на фосфорилиране на киназите Akt и JNK (съответно при Ser473 или Thr183/Tyr185) спрямо съответната нетретирана контрола. Прави впечатление, че тези клетки експресират предимно по-високомолекулните форми на JNK (54 kDa), а нивото на по-нискомолекулните (46 kDa) е много ниско. В пробите, изолирани на 14-ия час, се наблюдава понижено ниво на фосфорилираната при Ser338 форма на киназата c-Raf (p-c-Raf) – 2,5 пъти по-ниско в пробите, третирани с 10 μM Erufosine, и 5 пъти по-ниско в пробите, третирани с 40 μM Erufosine. Нивото на фосфорилираните при Ser217/221 форми на киназата MEK (MEK е субстрат на p-c-Raf) обаче е повишено (до 1,8 пъти) в клетките, третирани с 20 или 40 μM Erufosine (включително третираните за 6 часа). Не се наблюдават значителни промени нито в степента на фосфорилиране на киназата ERK (субстрат на p-MEK) при Thr202/Tyr204, нито в нивото на активираната киназа p90RSK, фосфорилирана при Ser380 (p90RSK е субстрат на p-ERK). Нивото на активирания транскрипционен фактор STAT3, фосфорилиран при Tyr705, се понижава след третиране на клетките с еруфозин. Това понижение е слабо изразено в пробите, третирани с 5-10 μM Erufosine, но нараства с концентрацията и е 10-кратно в пробите, третирани с 40 μM Erufosine, независимо дали за 6 или за 14 часа.



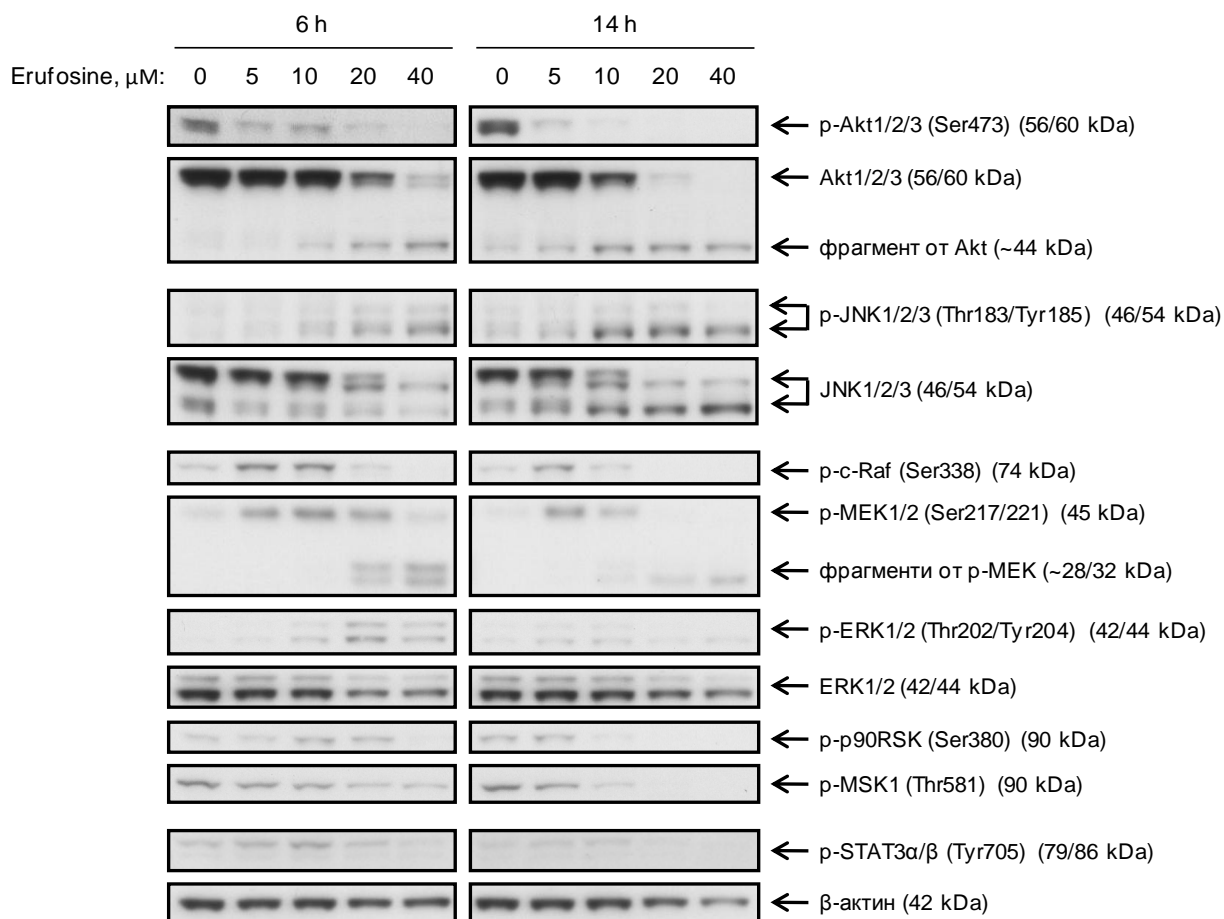
Фиг. IV.51. Въздействие на Erufosine върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки U-266. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби. Изследвани са и общите нива на някои от сигналните протеини (Akt, JNK и ERK) с цел да се провери дали се запазват постоянни в отделните проби.

Получените резултати за клетъчна линия OPM-2 са представени на фиг. IV.52. (снимки на блотовете) и на таблица IV.3. (денситометрични данни). Наблюдава се дефосфорилиране на p-Akt (Ser473) под действие на еруфозина. В клетките, третирани с 5 μM Erufosine за 6 часа, нивото на p-Akt е 2,5 пъти по-ниско от контролното и продължава да спада с нарастване на концентрацията на еруфозина. По-дългото въздействие (14 часа) оказва по-силен ефект, като в случая 20 μM Erufosine води до пълно дефосфорилиране на p-Akt. Еруфозинът освен това предизвиква фрагментиране и разграждане на Akt – ефект, който също е концентрационно-зависим, и се наблюдава при минимална концентрация от 10 μM . Наблюдаваният фрагмент от Akt е с молекулна маса около 44 kDa. Успоредно с разграждането на Akt настъпва разграждане на по-високомолекулните форми (54 kDa) на киназата JNK и при двете времена на въздействие, както и на по-нискомолекулните ѝ форми (46 kDa), но само при 6-часово въздействие с еруфозин. Точно обратното, в 14-часовите проби нивото на 46 kDa JNK се вдига до 5 пъти. В 6-ча-

Erufosine, μM	6 h					14 h				
	0	5	10	20	40	0	5	10	20	40
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,5	1,0	1,2	1,2	1,3	1,4
Относително ниво на p-c-Raf	1,0	1,1	0,7	0,6	1,3	1,0	0,9	0,4	0,3	0,2
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,0	0,9	1,4	1,5	1,0	1,0	1,1	1,6	1,8
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	0,9	0,8	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	1,2	1,2
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	0,8	0,8	1,1	1,4	1,0	0,6	0,8	0,8	1,1
Относително ниво на p-STAT3 α/β	1,0	0,7	0,4	0,2	0,1	1,0	1,0	0,6	0,4	0,1

Таблица IV.2. Въздействие на Erufosine върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки U-266. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за фосфорилираните форми са разделени на интензитетите за протеините, ползвани като контроли – съответно Akt1/2/3 за p-Akt1/2/3, β -актин за p-STAT3 α/β и ERK1/2 за останалите. Получените съотношения при нетретирани контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите.

совите проби успоредно с дефосфорилирането на p-Akt настъпва фосфорилиране на JNK. Нивото на 54 kDa p-JNK (Thr183/Tyr185) в клетките, третирани с 40 μM Erufosine, е 4 пъти по-високо от контролното, а нивото на 46 kDa p-JNK (Thr183/Tyr185) е съответно 13,7 пъти по-високо от контролното. Нивото на 46 kDa p-JNK в клетките, третирани с 40 μM Erufosine за 14 часа, пък е 15,8 пъти по-високо от контролното. Ниските концентрации еруфозин (5 и 10 μM) повишават нивата на p-c-Raf (Ser338) и p-MEK (Ser217/221), но при по-високи концентрации този ефект изчезва и дори се обръща в противоположната посока. Успоредно с понижаването на p-MEK при тези високи концентрации се наблюдава поява на фрагменти от MEK. Молекулните маси на тези фрагменти са около 28 и 32 kDa. При същите високи концентрации на еруфозин (20 и 40 μM) се отчита понижаване на общото ниво на ERK в 6-часовите проби. Това обаче е съпроводено с по-висока степен на фосфорилиране (и съответно активация) на ERK (около 20 пъти по-висока в клетките, третирани с 20 μM еруфозин). В 14-часовите проби нивата на p-ERK (Thr202/Tyr204) са повишени около 2-3 пъти в сравнение с нетретирания контрол. Високите концентрации еруфозин, приложени за 6 часа, понижават нивата на p-p90RSK (Ser380) и на активирания киназа MSK1, фосфорилирана при Thr581 (MSK1 също е субстрат на p-ERK). Същият ефект е по-силно изразен в 14-часо-



Фиг. IV.52. Въздействие на Erufosine върху нивото и степента на фосфорилиране (съотв. степента на функционална активност) на ключови сигнални протеини в миеломни клетки ОРМ-2. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби. Изследвани са и общите нива на някои от сигналните протеини (Akt, JNK и ERK) с цел да се провери дали се запазват постоянни в отделните проби.

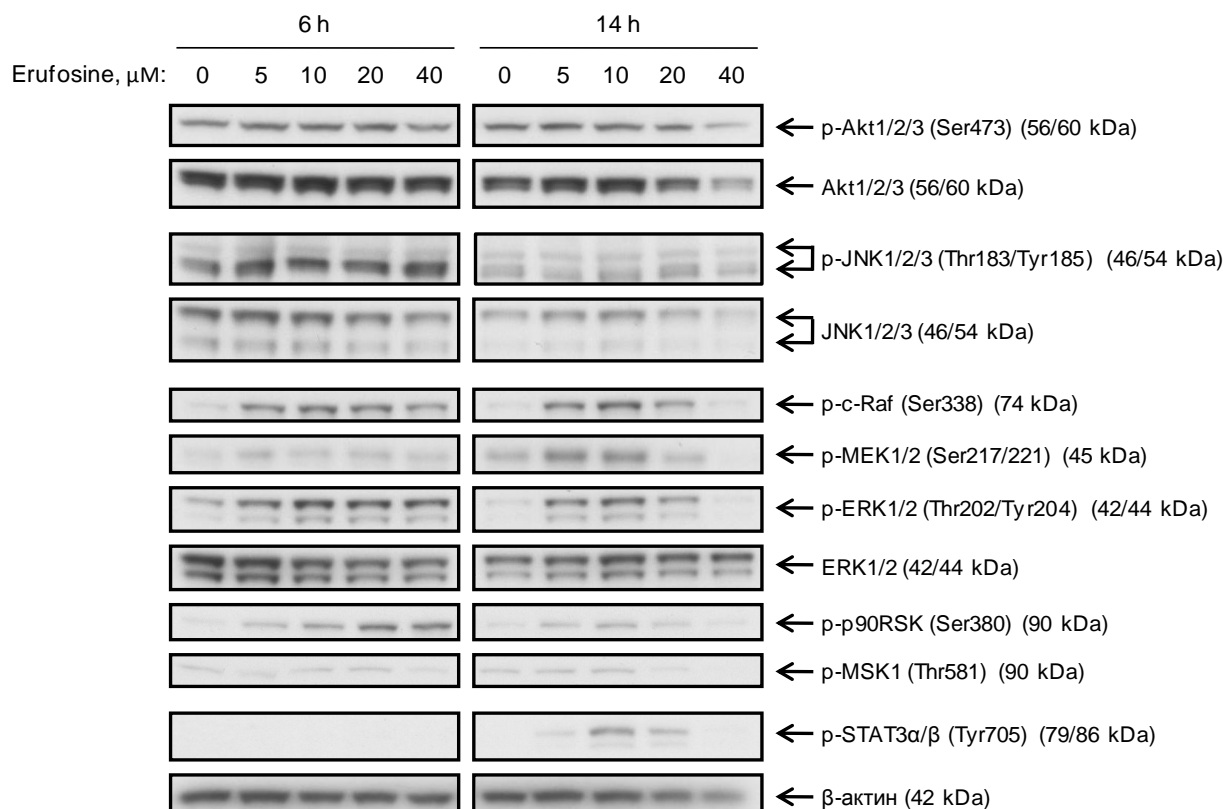
вите проби, където започва да се наблюдава при концентрация на Erufosine от 10 μM. При клетките, третирани с 10 или 20 μM Erufosine за 6 часа, обаче се забелязва известно повишение (около 2 пъти) на нивото на p-p90RSK. При клетките, третирани с 5 до 20 μM Erufosine за 6 часа, се наблюдава повишение (около 2 пъти) на нивото на p-STAT3 (Tyr705). Подобно повишение липсва в 14-часовите проби.

Получените резултати за клетъчна линия RPMI-8226 са представени на фиг. IV.53. (снимки на блотовете) и на таблица IV.4. (денситометрични данни). В никоя от пробите не се наблюдават значителни промени в нивото и степента на фосфорилиране на киназата Akt. Нивото на JNK също не се променя значително, но в 6-часовите проби се уста-

Erufosine, μM	6 h					14 h				
	0	5	10	20	40	0	5	10	20	40
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	0,4	0,5	0,2	0,1	1,0	0,15	0,05	0,02	0
Относително ниво на Akt1/2/3	1,0	1,0	1,0	0,6	0,2	1,0	1,1	0,6	0,05	0
Относително ниво на p-JNK1/2/3 54 kDa	1,0	0,9	1,8	3,3	4,0	1,0	0,8	1,5	1,8	0
Относително ниво на p-JNK1/2/3 46 kDa	1,0	1,8	4,5	9,0	13,7	1,0	1,3	9,6	13,3	15,8
Относително ниво на JNK1/2/3 54 kDa	1,0	1,0	1,0	0,6	0,3	1,0	1,0	0,7	0,3	0,3
Относително ниво на JNK1/2/3 46 kDa	1,0	0,6	0,7	0,6	0,3	1,0	1,6	1,8	2,3	5,2
Относително ниво на p-c-Raf	1,0	3,5	3,3	1,0	0,2	1,0	3,4	1,2	0,01	0
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	3,8	5,2	4,8	1,5	1,0	6,5	3,4	0,2	0
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	2,1	5,8	21,2	12,6	1,0	2,3	2,5	1,4	2,8
Относително ниво на ERK1/2	1,0	1,0	0,9	0,6	0,6	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	1,1	2,2	2,3	0,5	1,0	1,0	0,3	0,05	0
Относително ниво на p-MSK1	1,0	0,8	0,6	0,4	0,4	1,0	0,7	0,2	0	0
Относително ниво на p-STAT3 α/β	1,0	1,9	2,2	1,8	1,4	1,0	1,1	1,1	0,8	1,0

Таблица IV.3. Въздействие на Erufosine върху нивото и степента на фосфорилиране (съотв. степента на функционална активност) на ключови сигнални протеини в миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за изследваните протеини са разделени на съответните интензитети за контролния протеин β -актин. Получените съотношения при нетретирани контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите.

новява известно повишение в степента на фосфорилиране на JNK под действие на еруфозина. Такова повишение не се наблюдава в 14-часовите проби. Прави впечатление, че клетките RPMI-8226 експресират предимно 54 kDa JNK, но по-нискомолекулните (46 kDa) форми на JNK са фосфорилирани в по-голяма степен. Еруфозинът повишава нивото на p-c-Raf (Ser338). Сред 6-часовите проби, този ефект е най-силно изявен в третираната с 20 μM еруфозин (8,4-кратно повишение), а сред 14-часовите проби – в третираната с 10 μM еруфозин (8,9-кратно повишение). По подобен начин нараства и нивото на p-MEK (Ser217/221), но максималното повишение в случая е 2,6-кратно (при третиране с 20 μM еруфозин за 6 часа). В клетките, третирани с 40 μM еруфозин за 14 часа, обаче се наблюдава силен спад в нивото на p-MEK. Вижда се, че в повечето слу-



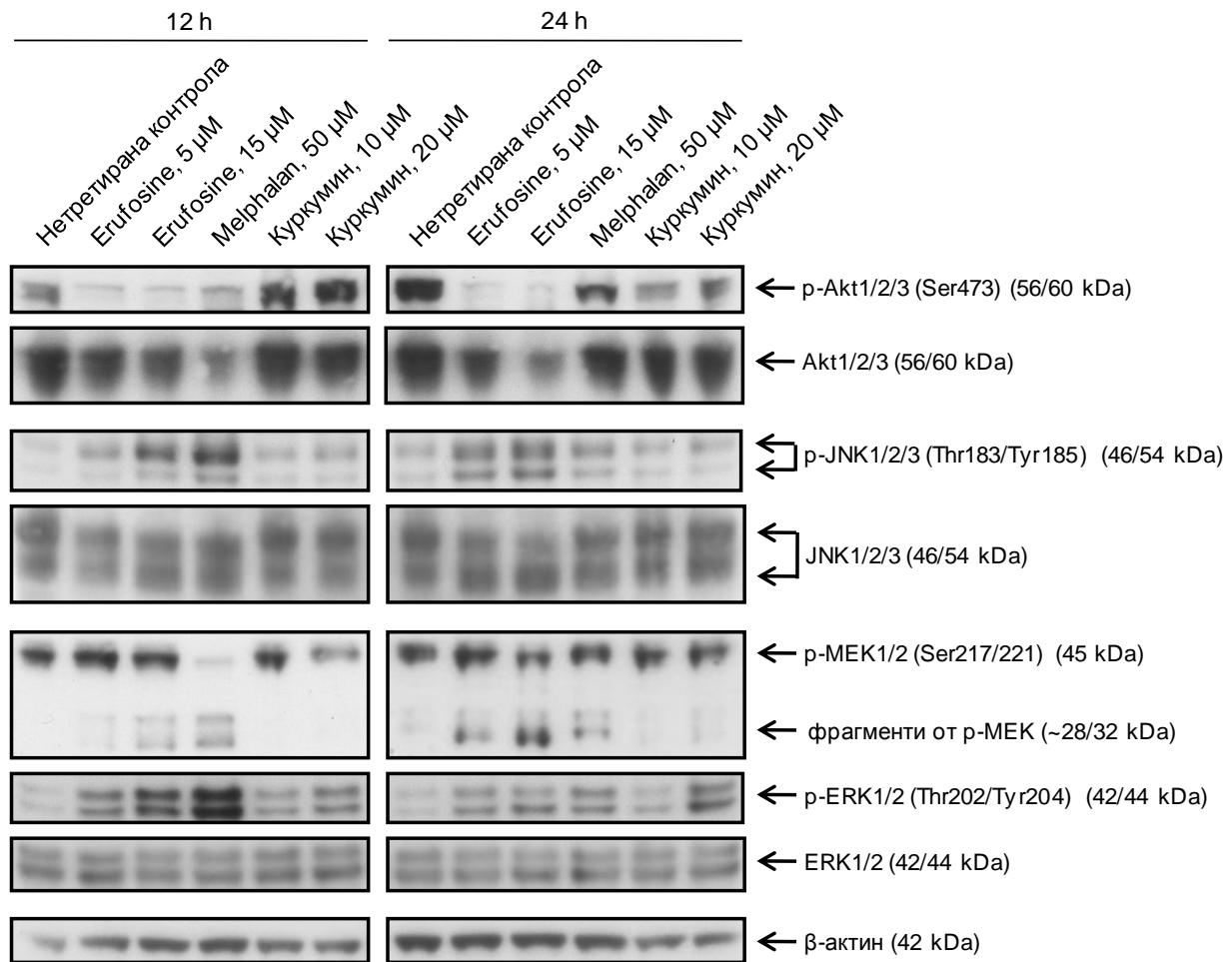
Фиг. IV.53. Въздействие на Erufosine върху степента на фосфорилиране (съотв. степента на функционална активност) на ключови сигнални протеини в миеломни клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби. Изследвани са и общите нива на някои от сигналните протеини (Akt, JNK и ERK) с цел да се провери дали се запазват постоянни в отделните проби.

чаи еруфозинът повишава степента на фосфорилиране на ERK. Сред 6-часовите проби, този ефект е най-силно изявен в третираните с 20 или 40 μM еруфозин (4,5-кратно повишение), а сред 14-часовите проби – в третираната с 5 μM еруфозин (5,7-кратно повишение). В клетките, третирани с 40 μM еруфозин за 14 часа се наблюдава спад в нивото на p-ERK (Thr202/Tyr204). По подобен начин се променя и нивото на p-p90RSK (Ser380). Сред 6-часовите проби, покачването на нивото на p-p90RSK е най-голямо в третираната с 40 μM еруфозин (15 пъти), а сред 14-часовите проби – в третираната с 10 μM еруфозин (2,1 пъти). Високите концентрации Erufosine предизвикват спад в нивото на p-MSK1 (Thr581). В никоя от 6-часовите проби не се открива p-STAT3 (Tyr705), но в 14-часовите проби може да се установи наличие на този активиран транскрипционен фактор, като нивото му е най-високо в клетките, третирани с 10 μM Erufosine.

Erufosine, μM	6 h					14 h				
	0	5	10	20	40	0	5	10	20	40
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	1,1	1,1	1,2	0,9	1,0	0,9	0,8	1,0	1,0
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	1,5	1,5	1,8	2,7	1,0	0,6	0,7	1,1	1,1
Относително ниво на p-c-Raf	1,0	5,0	7,5	8,4	6,3	1,0	8,0	8,9	6,2	1,0
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,7	1,9	2,6	2,4	1,0	1,5	1,2	0,6	0,1
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	2,3	4,2	4,5	4,5	1,0	5,7	5,6	3,7	0,3
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	3,3	6,9	13,5	15,0	1,0	1,8	2,1	1,5	0,5
Относително ниво на p-MSK1	1,0	0,8	1,1	1,4	0,6	1,0	0,9	0,8	0,3	0
Относително ниво на p-STAT3 α/β	0	0	0	0	0	0	1,0	5,0	3,5	0,6

Таблица IV.4. Въздействие на Erufosine върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с еруфозин в концентрации до 40 μM за период от 6 или 14 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за фосфорилираните форми са разделени на интензитетите за протеините, ползвани като контроли – съответно Akt1/2/3 за p-Akt1/2/3, β -актин за p-STAT3 α/β и ERK1/2 за останалите. Получените съотношения при нетретирани контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите (Изключение: при определянето на p-STAT3 α/β за единица е прието съотношението при пробата от клетки, третирани с 5 μM еруфозин за 14 часа, тъй като при нетретирани контроли не беше регистрирано наличие на p-STAT3 α/β).

При друг експеримент, проведен върху клетки OPM-2 и RPMI-8226, бяха сравнени промените в нивата и активационния статус на протеини от сигналните пътища PI3K/Akt, JNK/c-Jun и Ras/Raf/MEK/ERK след въздействие с различни вещества, имащи противомиеломно действие. Клетки OPM-2 бяха третирани в продължение на 12 или 24 часа с еруфозин (5 или 15 μM), мелфалан (50 μM) или куркумин (10 или 20 μM). Получените резултати са представени на фиг. IV.54 (снимки на блотовете) и на таблица IV.5. (денситометрични данни). Наблюдава се отчетливо понижаване на нивото на p-Akt (Ser473) в клетките, третирани с еруфозин (10-кратно понижаване) или мелфалан (5-кратно понижаване) в продължение на 12 часа. В пробите, третирани с еруфозин, това ниско ниво се запазва и на 24-ия час, докато в пробите, третирани с мелфалан, нивото на p-Akt търпи известно възстановяване до 40% от изходното. И двете вещества предизвикват понижаване на общото количество Akt, като отново ефектът на мелфалана е по-слаб на 24-ия час, отколкото на 12-ия. Известно понижаване на p-Akt се отчита и в



Фиг. IV.54. Въздействие на различни вещества върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за 12 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби. Изследвани са и общите нива на някои от сигналните протеини (Akt, JNK и ERK) с цел да се провери дали се запазват постоянни в отделните проби.

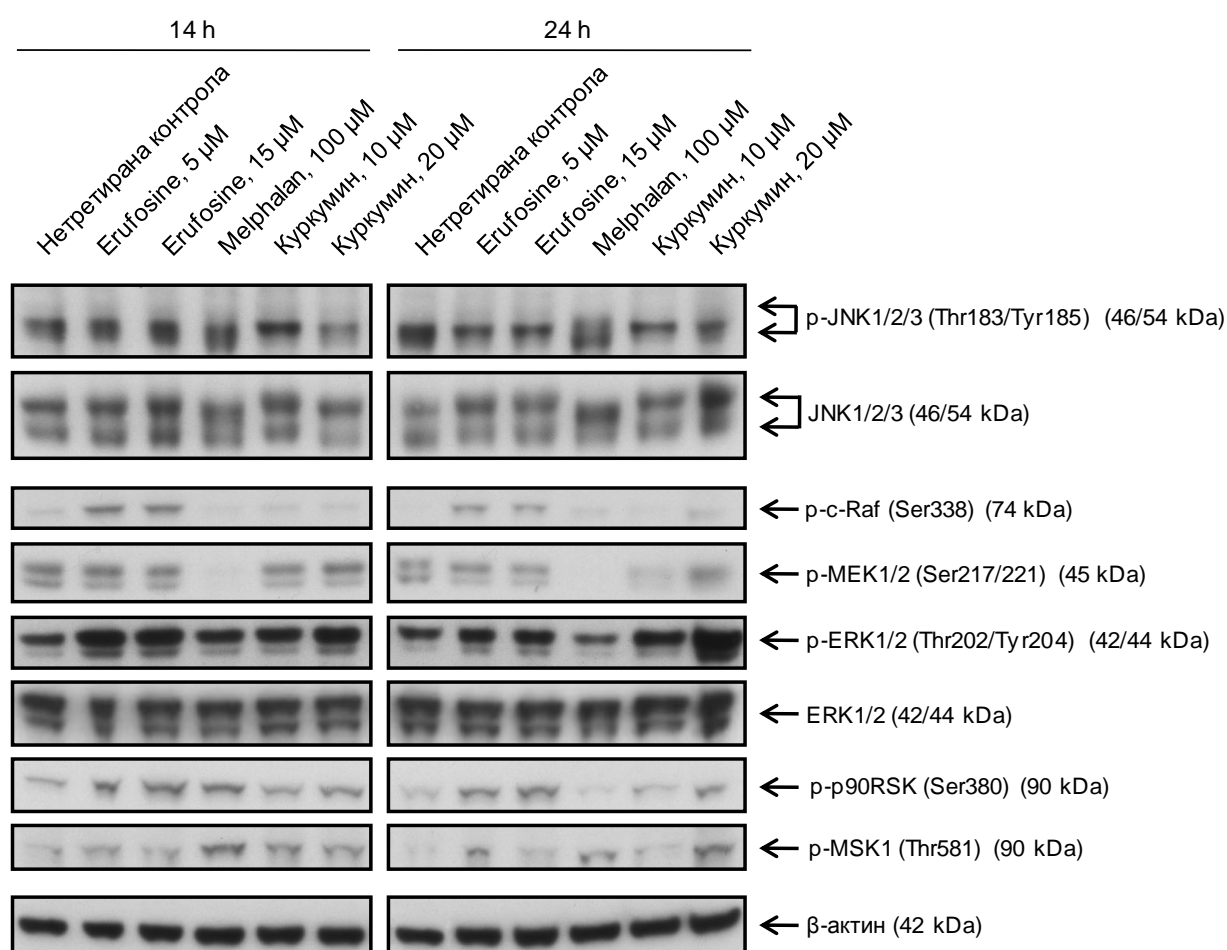
клетките, третирани с куркумин (до 2 пъти в 24-часовите проби). Успоредно с понижаването на p-Akt се наблюдава повишаване на степента на фосфорилиране на JNK. Нивото на p-JNK (Thr183/Tyr185) в клетките, третирани с 15 μM еруфозин, е 6,2 или 3,3 пъти по-високо от контролното (съотв. при 12- или 24-часово въздействие). Нивото на p-JNK в клетките, третирани с 50 μM мелфалан, е 7,9 или 1,8 пъти по-високо от контролното (съотв. при 12- или 24-часово въздействие). Известно повишение на нивото на p-JNK (до 2,6 пъти) се регистрира и в клетките, третирани с куркумин за 12 часа, но не и в 24-часовите проби. Вижда се, че еруфозинът и мелфаланът индуцират разграждане на MEK с поява на фрагменти, чиито молекулни маси са около 28 и 32 kDa. Най-голямо

OPM-2	12 h					
	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 50 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	0,1	0,1	0,2	0,6	0,8
Относително ниво на Akt1/2/3	1,0	0,3	0,2	0,1	0,4	0,4
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	3,7	6,2	7,9	2,2	2,6
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,2	1,3	0,1	0,9	0,5
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	3,6	7,0	9,6	2,8	3,4
OPM-2	24 h					
	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 µM	Erufosine, 15 µM	Melphalan, 50 µM	Куркумин, 10 µM	Куркумин, 20 µM
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	0,1	0,1	0,6	0,5	0,7
Относително ниво на Akt1/2/3	1,0	0,7	0,4	0,8	1,1	1,3
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	2,7	3,3	1,8	1,0	0,9
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,5	0,9	1,0	1,1	1,1
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	2,7	2,8	2,6	1,5	3,8

Таблица IV.5. Въздействие на различни вещества върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за 12 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за фосфорилираните форми са разделени на интензитетите за протеините, ползвани като контроли – съответно β-актин за p-Akt1/2/3 и Akt1/2/3, JNK1/2/3 за p-JNK1/2/3 и ERK1/2 за p-MEK1/2 и p-ERK1/2. Получените съотношения при нетретираните контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите.

понижение на нивото на p-MEK (Ser217/221) се наблюдава в клетките, третирани с 50 µM мелфалан за 12 часа. Куркуминът не оказва значително влияние върху p-MEK. Всички изследвани вещества повишават степента на фосфорилиране на ERK. След третиране с Erufosine или Melphalan този ефект е по-силно изразен на 12-ия, отколкото на 24-ия час. Нивото на p-ERK (Thr202/Tyr204) в клетките, третирани с 15 µM еруфозин, е 7,0 или 2,8 пъти по-високо от контролното (съотв. при 12- или 24-часово въздействие). Нивото на p-ERK в клетките, третирани с 50 µM мелфалан, е 9,6 или 2,6 пъти по-високо от контролното (съотв. при 12- или 24-часово въздействие). Количеството на p-ERK е приблизително еднакво повишено в клетките, третирани с куркумин за 12 или за 24 часа, и достига до 3,8 пъти над контролното.

Клетки RPMI-8226 бяха третирани в продължение на 14 или 24 часа с еруфозин (5 или 15 μM), мелфалан (100 μM) или куркумин (10 или 20 μM). Получените резултати са представени на фиг. IV.55. (снимки на блотовете) и на таблица IV.6. (денситометрични данни). Не се наблюдават значителни промени в общото ниво и в степента на фосфорилиране на различните форми на киназата JNK. Бандовете за този протеин обаче лежат малко по-ниско при пробите, третирани с мелфалан, отколкото при нетретирания контрол и пробите, третирани с еруфозин или куркумин. Еруфозинът значително повишава нивото на p-c-Raf (Ser338) в клетките. В една от пробите, третирани с куркумин (20 μM за 24 часа), също се наблюдава повишено ниво на p-c-Raf. Еруфозинът и куркуми-



Фиг. IV.55. Въздействие на различни вещества върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за 14 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β -актин в отделните проби. Изследвани са и общите нива на някои от сигналните протеини (JNK и ERK) с цел да се провери дали се запазват постоянни в отделните проби.

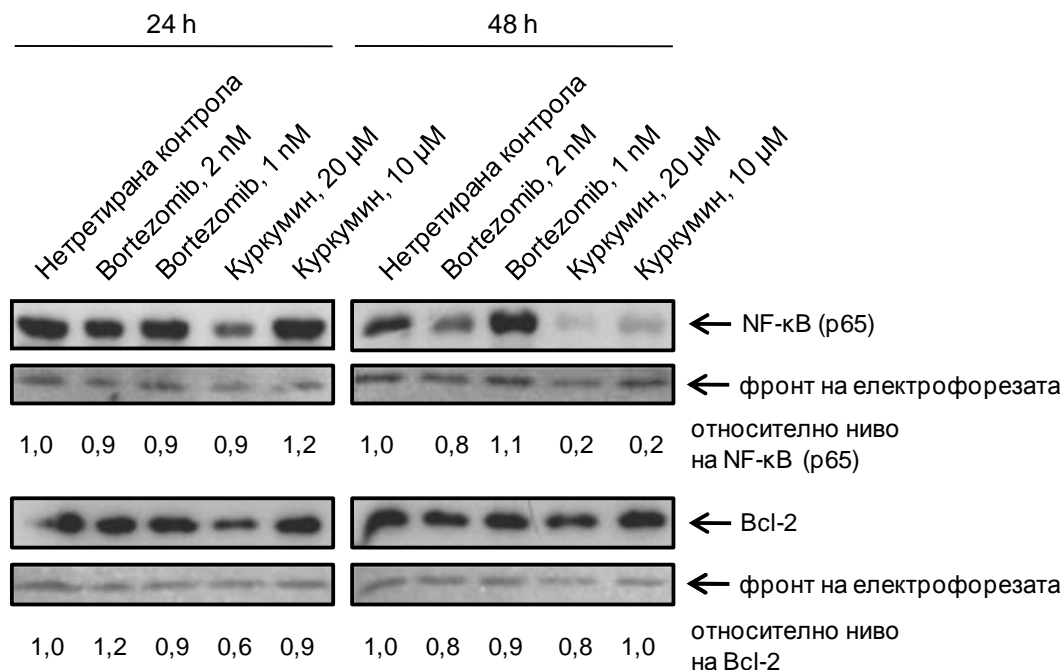
RPMI-8226	14 h					
	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 μ M	Erufosine, 15 μ M	Melphalan, 100 μ M	Куркумин, 10 μ M	Куркумин, 20 μ M
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	0,8	0,9	1,0	1,1	0,8
Относително ниво на p-c-Raf	1,0	6,7	5,6	0,3	0,7	0,5
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,1	0,7	0,1	0,7	0,8
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	2,3	1,9	1,2	1,3	1,6
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	2,0	2,8	2,0	1,2	1,5
Относително ниво на p-MSK1	1,0	2,0	1,5	3,4	2,4	2,1
RPMI-8226	24 h					
	Нетретирана контрола	Erufosine, 5 μ M	Erufosine, 15 μ M	Melphalan, 100 μ M	Куркумин, 10 μ M	Куркумин, 20 μ M
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	0,7	0,6	0,7	0,5	0,5
Относително ниво на p-c-Raf	1,0	16,1	12,9	3,1	1,1	6,7
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	0,8	0,7	0	0,4	1,0
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	1,0	1,1	0,6	1,3	2,0
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	2,0	2,4	0,4	0,9	1,3
Относително ниво на p-MSK1	1,0	4,4	2,5	4,5	2,2	9,6

Таблица IV.6. Въздействие на различни вещества върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини в миеломни клетки RPMI-8226. Клетките са третирани с различни концентрации Erufosine, Melphalan или куркумин за 14 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за фосфорилираните форми са разделени на интензитетите за протеините, ползвани като контроли – съответно β -актин за p-Akt1/2/3 и Akt1/2/3, JNK1/2/3 за p-JNK1/2/3 и ERK1/2 за p-MEK1/2 и p-ERK1/2. Получените съотношения при нетретираните контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите.

нът не повлияват съществено нивото на p-MEK (Ser217/221). От друга страна, мелфаланът (50 μ M за 14 часа), без да предизвиква промени в нивото на p-c-Raf, води до 10-кратно понижаване на нивото на p-MEK. В съответните 24-часови проби дори не се установява наличие на p-MEK. Всички изследвани вещества повишават степента на фосфорилиране на ERK, когато са приложени за 14 часа. Повишението е най-голямо (2 пъти) в клетките, третирани с Erufosine. Сред 24-часовите проби подобно повишение се наблюдава само в третираната с 20 μ M куркумин проба, а в третираната с мелфалан се

отчита по-ниска степен на фосфорилиране на ERK, отколкото в контролата. Всички изследвани вещества повишават нивото на p-p90RSK (Ser380), когато са приложени за 14 часа. Повишението е най-голямо (2,8 пъти) в клетките, третирани с 15 μM Erufosine. В 24-часовите проби също се отчита повишение на нивото на p-p90RSK под действие на еруфозина, докато мелфаланът в случая предизвиква понижаване (2,5-кратно). Всички изследвани вещества повишават нивото на p-MSK1 (Thr581). Сред 14-часовите проби, покачването на нивото на p-MSK1 е най-голямо в третираната със 100 μM Melphalan (3,4 пъти), а сред 24-часовите проби – в третираната с 20 μM куркумин (9,6 пъти).

При друг експеримент беше сравнено влиянието на Vortezomib и на куркумин върху нивата на NF- κB и Bcl-2 в миеломни клетки U-266. Клетките бяха третирани в продължение на 24 или 48 часа с Vortezomib (1 или 2 nM) или куркумин (10 или 20 μM). Получените резултати са представени на фиг. IV.56. Наблюдава се 5-кратно понижение на нивото на NF- κB p65 в клетките, третирани с куркумин за 48 часа. Слабо понижение (с около 20%) се установява и в клетките, третирани с 2 nM бортезомиб за 48 часа. Бортезомибът не повлиява съществено нивото на Bcl-2, а по-високата концентрация куркумин слабо го понижава (с около 40% на 24-ия час).



Фиг. IV.56. Въздействие на Vortezomib и куркумин върху нивата на NF- κB и Bcl-2 в миеломни клетки U-266. Клетките са третирани за 24 или 48 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Числовите стойности показват относителния интензитет на бандовете за NF- κB или Bcl-2 спрямо съответните контроли. При изчисляването им са взети предвид евентуални отклонения в количеството нанесен протеин, установени чрез оцветяване на фронта на електрофорезата с Ponceau S.

Съвкупността от представените експериментални данни показва, че еруфозинът, куркуминът и мелфаланът индуцират промени в някои сигнално-трансдукционни пътища при миеломни клетки. Тези промени включват:

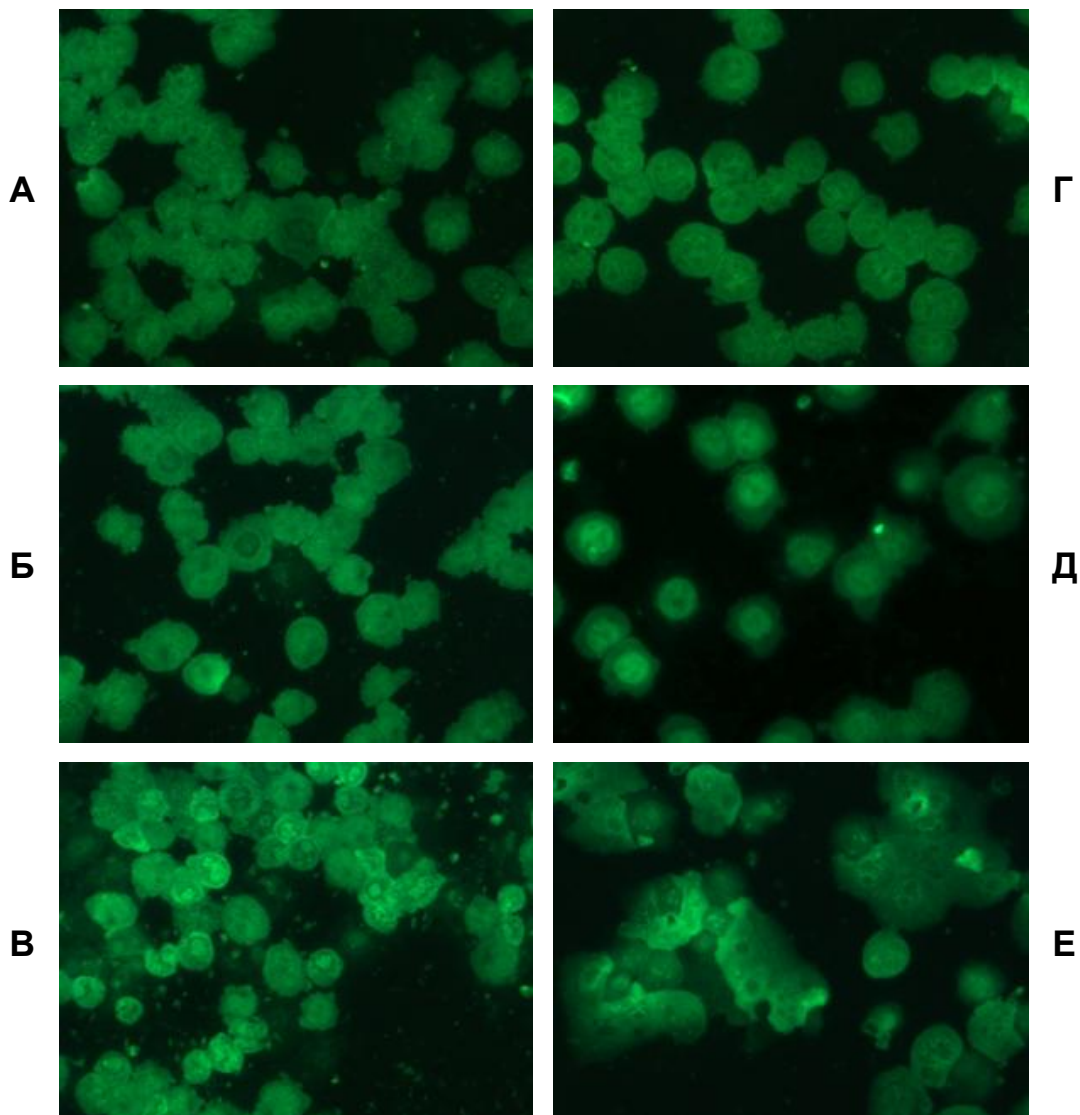
- дефосфорилиране и фрагментиране на киназата Akt;
- фосфорилиране на киназата JNK;
- преходно активиране на сигналния път Raf/MEK/ERK, последвано от фрагментиране на MEK;
- снижаване на нивото на p65-субединицата на NF-κB след въздействие с куркумин.

2.3. Въздействие върху мембранните липидни рафтове

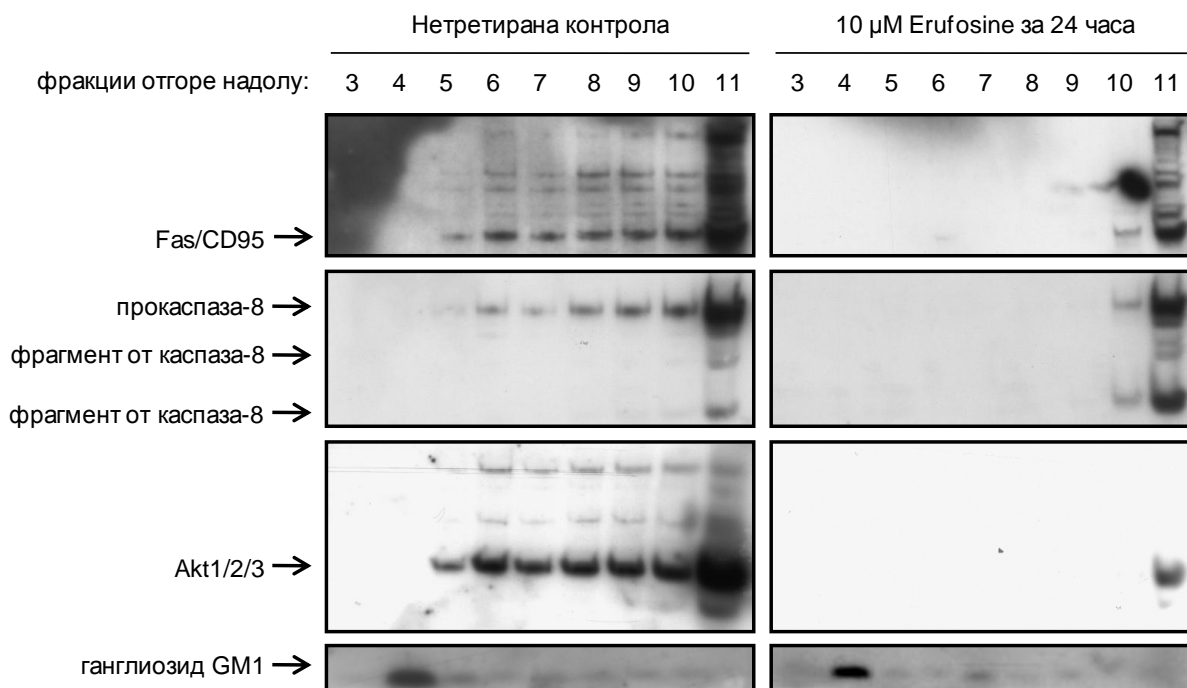
Клетки OPM-2 и RPMI-8226 бяха третирани с Erufosine (5 или 10 μM) за 12 или 40 часа. След това от клетките бяха приготвени микроскопски препарати и ганглиозид GM1-съдържащите мембранни липидни рафтове бяха визуализирани чрез оцветяване с CTxB-FITC. Получените резултати са представени на фиг. IV.57. Вижда се, че плътността на липидните рафтове е по-голяма в третираните клетки, отколкото в контролните. Промените в клетки OPM-2 са много по-отчетливи след третиране с 10 μM еруфозин (снимка В), отколкото с по-ниската концентрация (5 μM; снимка Б). По дългото излагане на действието на еруфозина също е свързано с по-силен ефект, както може да се види при сравняване на клетки RPMI-8226, третирани с 10 μM Erufosine за 12 часа (снимка Д) или 40 часа (снимка Е).

Клетки OPM-2 бяха третирани с 10 μM Erufosine за 24 часа, след което бяха лизирани и подложени на ултрацентрофугиране в захарозен градиент. Отделените фракции бяха анализирани чрез имуноблот за съдържание на някои сигнални протеини (Fas/CD95, Akt и прокаспаза-8, вкл. активните ѝ фрагменти). Получените резултати са представени на фиг. IV.58. Вижда се, че еруфозинът предизвиква преразпределяне на изследваните сигнални молекули. В пробите от нетретирани клетки значителна част от общите количества Fas/CD95 (известен още като „рецептор на смъртта”), прокаспаза-8 и Akt (известен още като протеин-киназа B) се открива във фракциите от 4. до 7., в които типично се концентрират липидните рафтове. В пробите от третирани с еруфозин клетки тези протеини се откриват само в придънните фракции на захарозния градиент, т.е. еруфозинът предизвиква отделяне на споменатите протеини от липидните рафтове.

Аналогичен експеримент беше проведен и с клетки RPMI-8226, но в случая бяха прилагани две различни концентрации Erufosine (3,5 и 15 μM), всяка от тях при две различни времена на въздействие (12 и 24 часа). Получените резултати са представени на фиг. IV.59. И тук в пробите от нетретирани клетки значителна част от общите количества Fas/CD95, прокаспаза-8 и Akt се намира във фракциите от 4. до 7. В пробите от третирани с еруфозин клетки не настъпват особено изразени промени – присъствието на Fas/CD95 и прокаспаза-8 се измества само с 1-2 фракции надолу и то само при клетките, третирани с 3,5 μM еруфозин.



Фиг. IV.57. Миеломни клетки, при които богатите на ганглиозид GM1 участъци в мембраните (т. нар. липидни рафтове) са визуализирани чрез оцветяване със субединица В на холератоксина (СТхВ), конюгирана с флуоресцеин-изотиоцианат (FITC). А – нетретирани клетки ОРМ-2; Б – клетки ОРМ-2, третирани с 5 μM еруфозин за 12 часа; В – клетки ОРМ-2, третирани с 10 μM еруфозин за 12 часа; Г – нетретирани клетки RPMI-8226; Д – клетки RPMI-8226, третирани с 10 μM еруфозин за 12 часа; Е – клетки RPMI-8226, третирани с 10 μM еруфозин за 40 часа.



Фиг. IV.58. Влияние на Erufosine върху присъствието на Fas/CD95, прокаспаза-8 и Akt в ганглиозид GM1-съдържащите мембранни 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 връхната към дънната, които след това са анализирани чрез имуноблот за съдържание на въпросните протеини и на ганглиозид GM1.

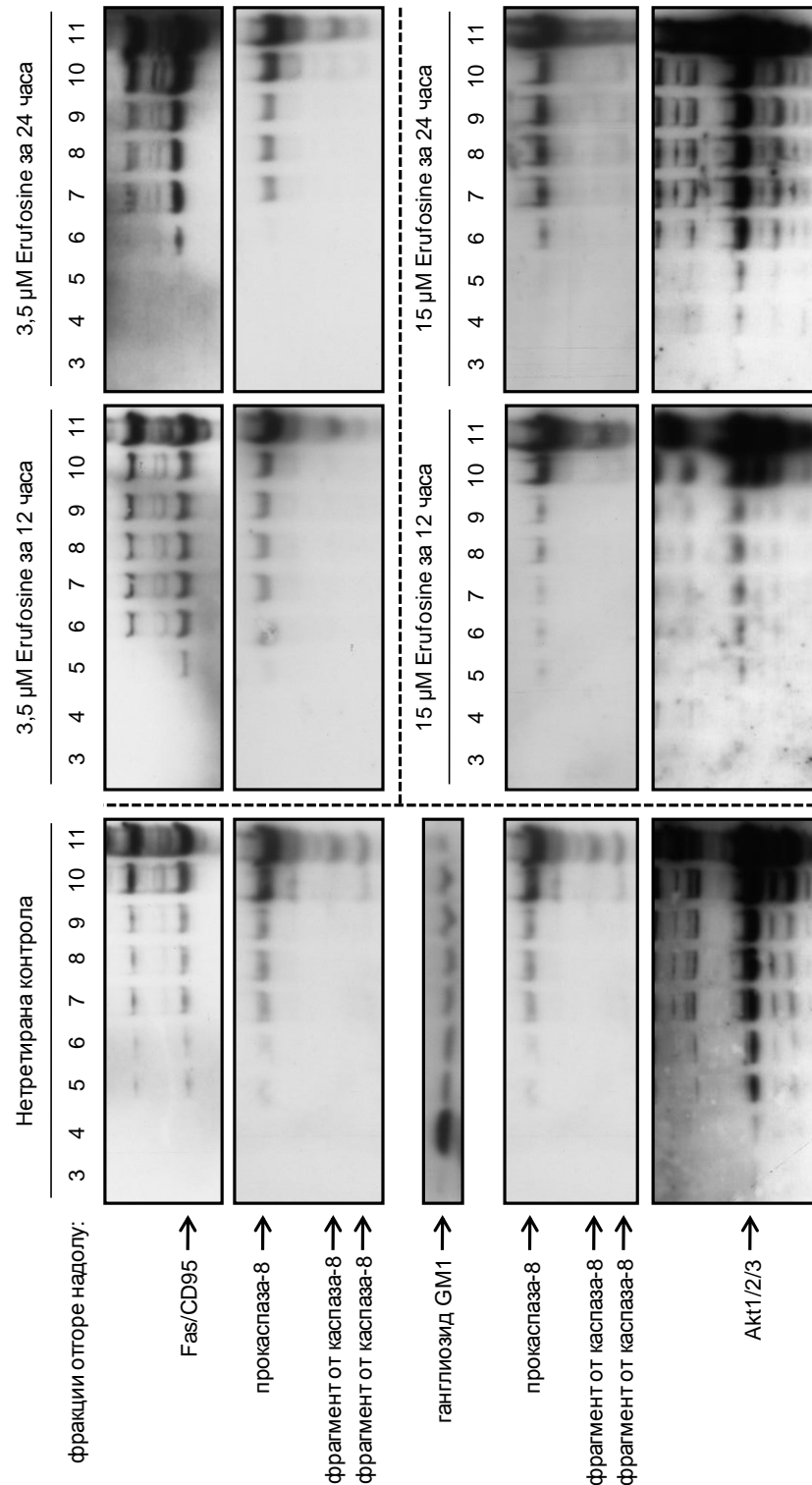
В обобщение може да се каже, че Erufosine предизвиква следните промени в мембранните липидни рафтове при миеломни клетки:

- увеличена плътност на ганглиозид GM1-съдържащите мембранни домени (липидни рафтове), ясно видима при маркиране с CTxB-FITC;
- намаляване на съдържанието на цитокиновия рецептор Fas/CD95, киназата Akt и прокаспаза-8.

Тези промени вероятно отразяват началното въздействие на алкилфосфохолина върху миеломните клетки.

2.4. Изследвания върху взаимодействието между куркумин и As₂O₃ при клетки OPM-2

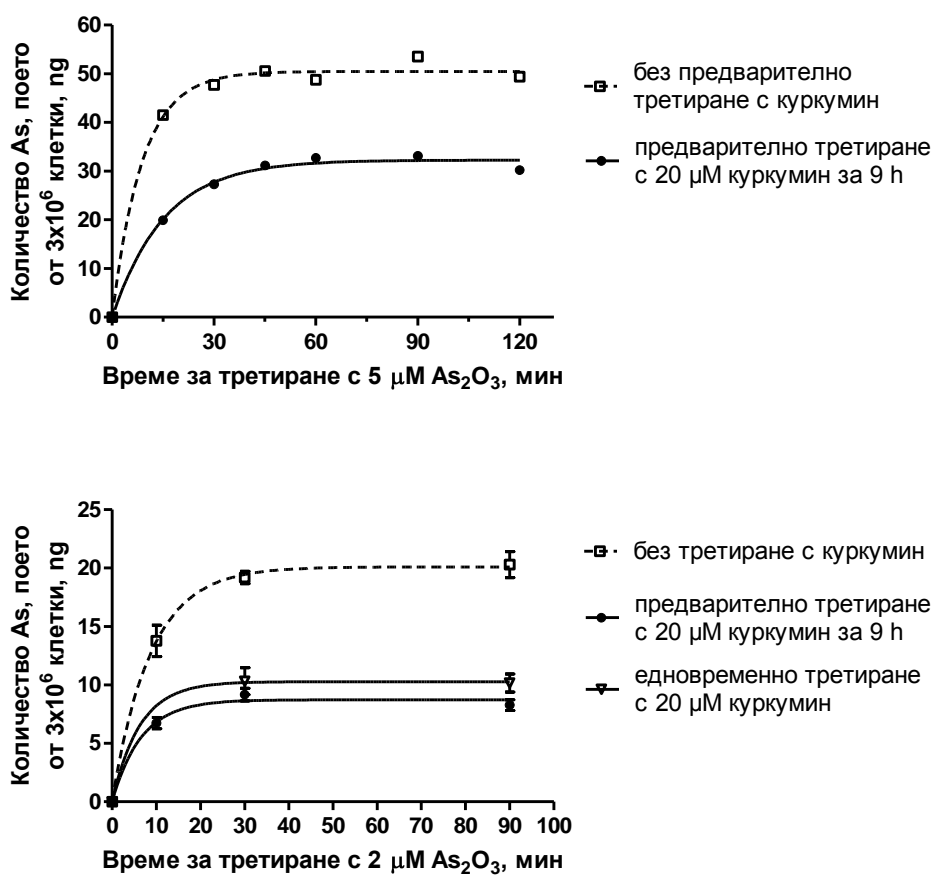
Беше изследвано натрупването на арсен в клетки OPM-2 след третиране с диарсенов триоксид. Количеството натрупан арсен беше сравнено при клетки, които са третирани



Фиг. IV.59. Липса на значително влияние на Erufosine върху присъствието на Fas/CD95, прокаспаза-8 и Akt в ганглиозид GM1-съдържащите липидни рафтове при клетки RPMI-8226. 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.

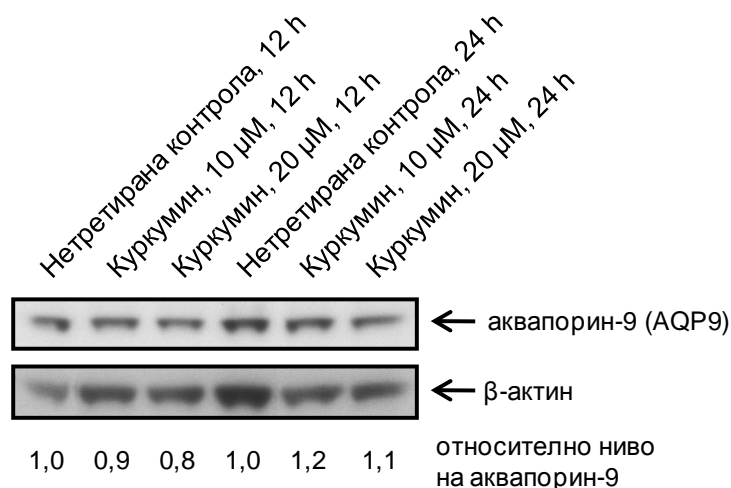
само с As_2O_3 и клетки, които преди това са били третирани с куркумин или пък са третирани едновременно с As_2O_3 и куркумин. Получените резултати са представени на фиг. IV.60. Вижда се, че след третиране на клетките с $5 \mu\text{M}$ As_2O_3 , вътреклетъчното ниво на арсен достига плато към 45-тата минута (около 50 ng As на $3 \cdot 10^6$ клетки). Когато клетките са били третирани предварително с $20 \mu\text{M}$ куркумин за 9 часа, плато се достига към 60-тата минута, но на по-ниско ниво (около $32\text{-}33 \text{ ng As}$ на $3 \cdot 10^6$ клетки).

След третиране на клетките с $2 \mu\text{M}$ As_2O_3 , вътреклетъчното ниво на арсен достига до около 20 ng на $3 \cdot 10^6$ клетки. Когато клетките са били третирани предварително с $20 \mu\text{M}$ куркумин за 9 часа, се постига максимално вътреклетъчно ниво от около 9 ng As на $3 \cdot 10^6$ клетки. При едновременно третиране с $2 \mu\text{M}$ As_2O_3 и $20 \mu\text{M}$ куркумин се постига максимално вътреклетъчно ниво от около $10,2\text{-}10,3 \text{ ng As}$ на $3 \cdot 10^6$ клетки.



Фиг. IV.60. Влияние на куркумин върху скоростта и степента на натрупване на As_2O_3 в миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани с $20 \mu\text{M}$ 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 спектроскопия.

Беше изследвано влиянието на куркумина върху експресията на аквапорин-9 (AQP9), считан за основен посредник при трансмембрания транспорт на As_2O_3 . Клетки ОРМ-2 бяха третирани с 10 или 20 μM куркумин за два различни периода от време (12 и 24 часа), след което бяха изследвани чрез имуноблот за промени в нивото на AQP9. Получените резултати са представени на фиг. IV.61. Вижда се, че куркуминът не предизвиква съществени изменения в никоя от изследваните проби.



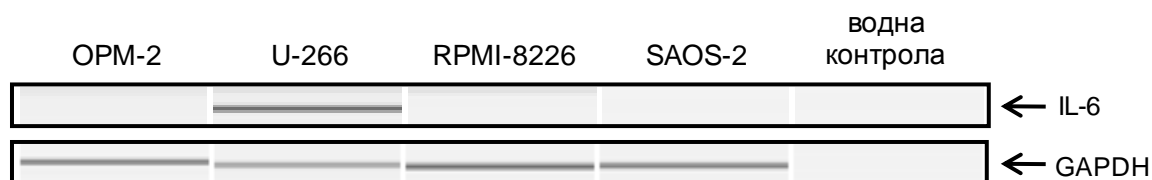
Фиг. IV.61. Липса на съществено въздействие на куркумин върху нивото на експресия на аквапорин-9 в клетки ОРМ-2. Клетките са третирани с куркумин в концентрации 10 или 20 μM за период от 12 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за аквапорин-9 са разделени на съответните интензитети за контролния протеин β -актин. Получените съотношения при нетретираните контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите.

3. Влияние на различни извънклетъчни и вътреклетъчни фактори върху противомиеломния ефект на изследваните вещества

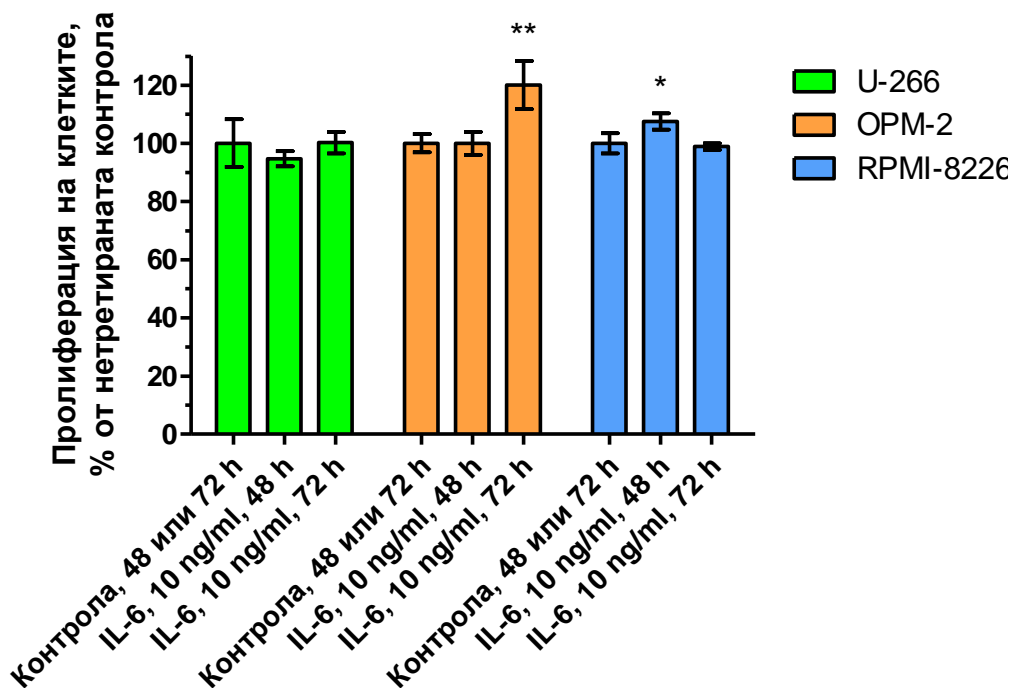
3.1. Влияние на интерлевкин-6 (IL-6)

Преди да се изследва влиянието на IL-6 върху противомиеломния ефект на проучваните вещества, беше направена съпоставка чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на IL-6 в нетретирани клетки U-266, OPM-2, RPMI-8226 и SAOS-2. Получените резултати са представени на фиг. IV.62. Вижда се, че единствено в клетки U-266 има наличие на иРНК за синтез на IL-6. Беше изследвано и влиянието на самостоятелно приложен IL-6 върху пролиферационната активност на миеломни клетки от трите линии. IL-6 беше прилаган в концентрация 10 ng/ml при две различни времена на въздействие – 48 и 72 h. Получените резултати са представени на фиг. IV.63. Наблюдава се стимулиране на пролиферацията на клетки OPM-2 с около 20% след 72-часово въздействие с IL-6 ($P < 0,001$), както и на клетки RPMI-8226 с около 7,5% след 48-часово въздействие с IL-6 ($P < 0,01$). При клетки U-266 не се отчитат промени в пролиферационната активност.

Бяха изследвани цитотоксичните ефекти след едновременно третиране на миеломни клетки с IL-6 и различни вещества с установено противомиеломно действие. На фиг. IV.64. са представени получените резултати при едновременно приложение на **Erufosine** и IL-6 за 48 часа. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки OPM-2, кривата, изра-



Фиг. IV.62. Сравнение чрез RT-PCR (40 цикъла) на нивата на иРНК за синтез на интерлевкин-6 (IL-6) в миеломните клетъчни линии OPM-2, U-266 и RPMI-8226 и в остеосаркомната SAOS-2. Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции е проконтролирано чрез паралелна PCR (25 цикъла) със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH).

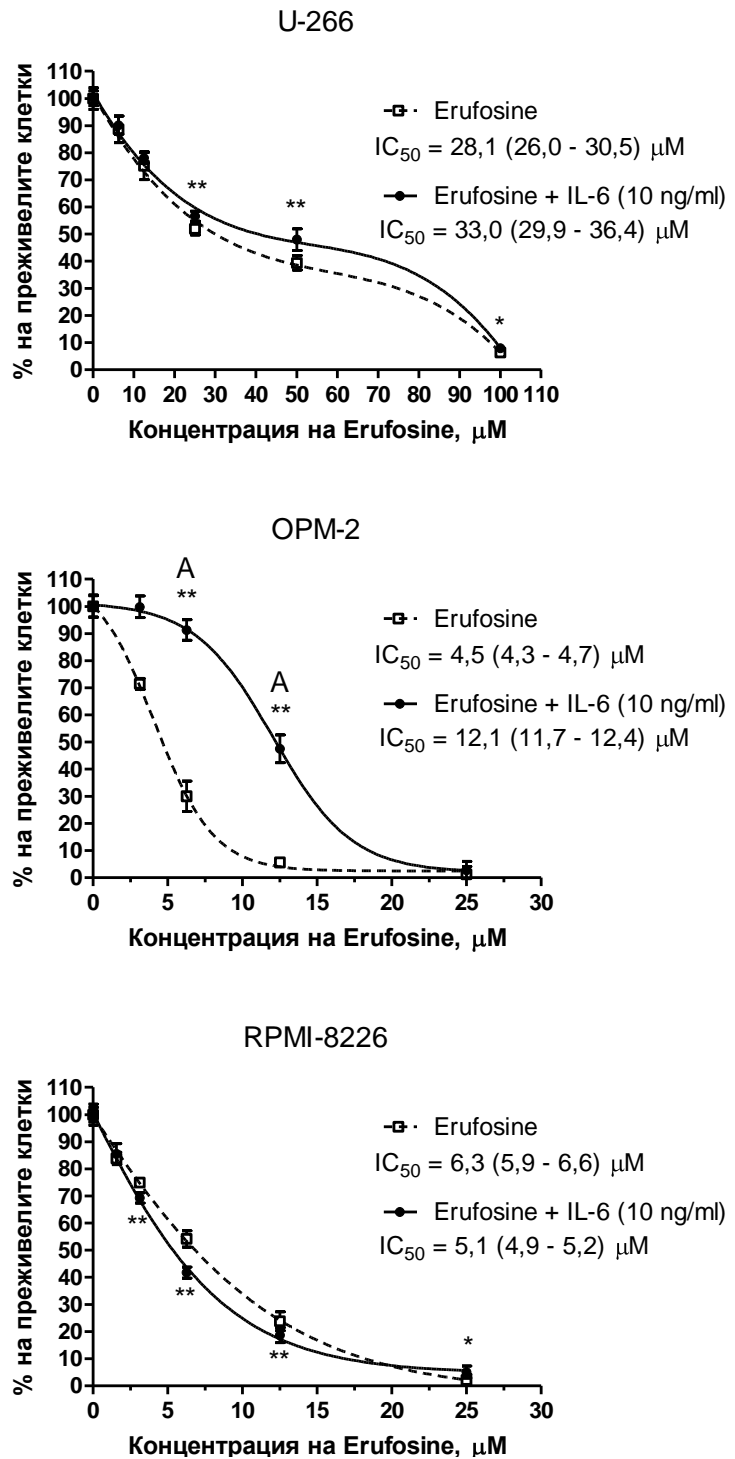


Фиг. IV.63. Влияние на IL-6 върху пролиферацията на миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Степента на пролиферация на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия и 72-ия час след еднократно третиране с 10 ng/ml IL-6. Процентите на пролиферация в третираните проби са изчислени спрямо съответните нетретиранни контроли, приети за 100%. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значима разлика спрямо съответната нетретирана контрола. Една звездичка отговаря на $P < 0,01$, а две – на $P < 0,001$.

звяща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. При концентрации 6,25 и 12,5 μM Erufosine разликите са особено големи (съответно 91,3% преживели клетки в присъствие на IL-6 срещу 30,0% в отсъствието му и 47,6% преживели клетки в присъствие на IL-6 срещу 5,7% в отсъствието му; $P < 0,01$ и за двата случая) и отговарят на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. $IC_{50(48h)}$ на Erufosine за клетъчната линия OPM-2 е 12,1 (11,7 - 12,4) μM в присъствие на IL-6 и 4,5 (4,3 - 4,7) μM в отсъствието му. При клетки U-266 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на еруфозина в присъствие на IL-6 ($P < 0,01$ при 25 и 50 μM Erufosine; $P < 0,05$ при 100 μM Erufosine). $IC_{50(48h)}$ на Erufosine за тази клетъчна линия е 33,0 (29,9 - 36,4) μM в присъствие на IL-6 и 28,1 (26,0 - 30,5) μM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-ниско от съответната крива за нетретираните с IL-6

клетки. Разликата е статистически значима при 3,125, 6,25 и 12,5 μM Erufosine ($P < 0,01$ и за трите случая). $\text{IC}_{50(48\text{h})}$ на Erufosine за клетъчната линия RPMI-8226 е 5,1 (4,9 - 5,2) μM в присъствие на IL-6 и 6,3 (5,9 - 6,6) μM в отсъствието му.

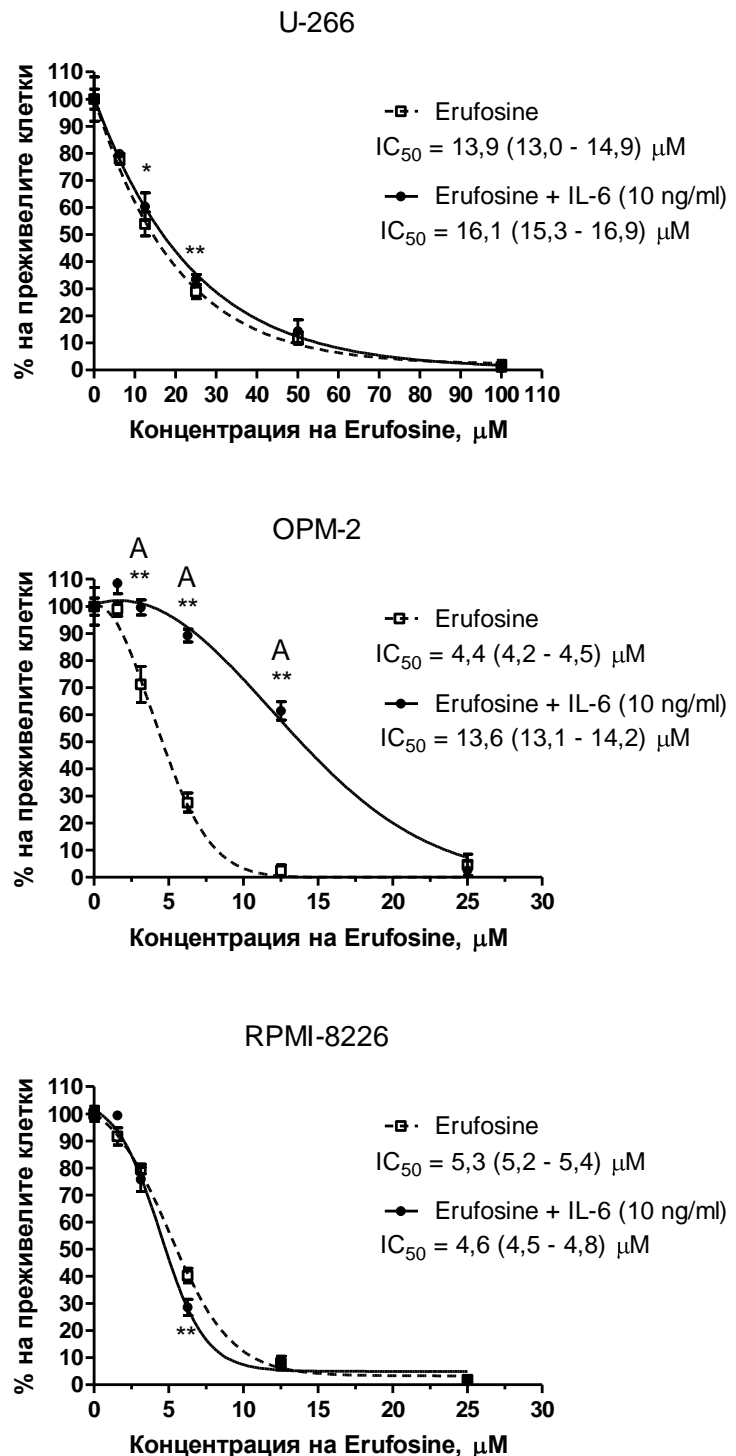
Фиг. IV.64. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживяелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с еруфозин 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. 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 А.

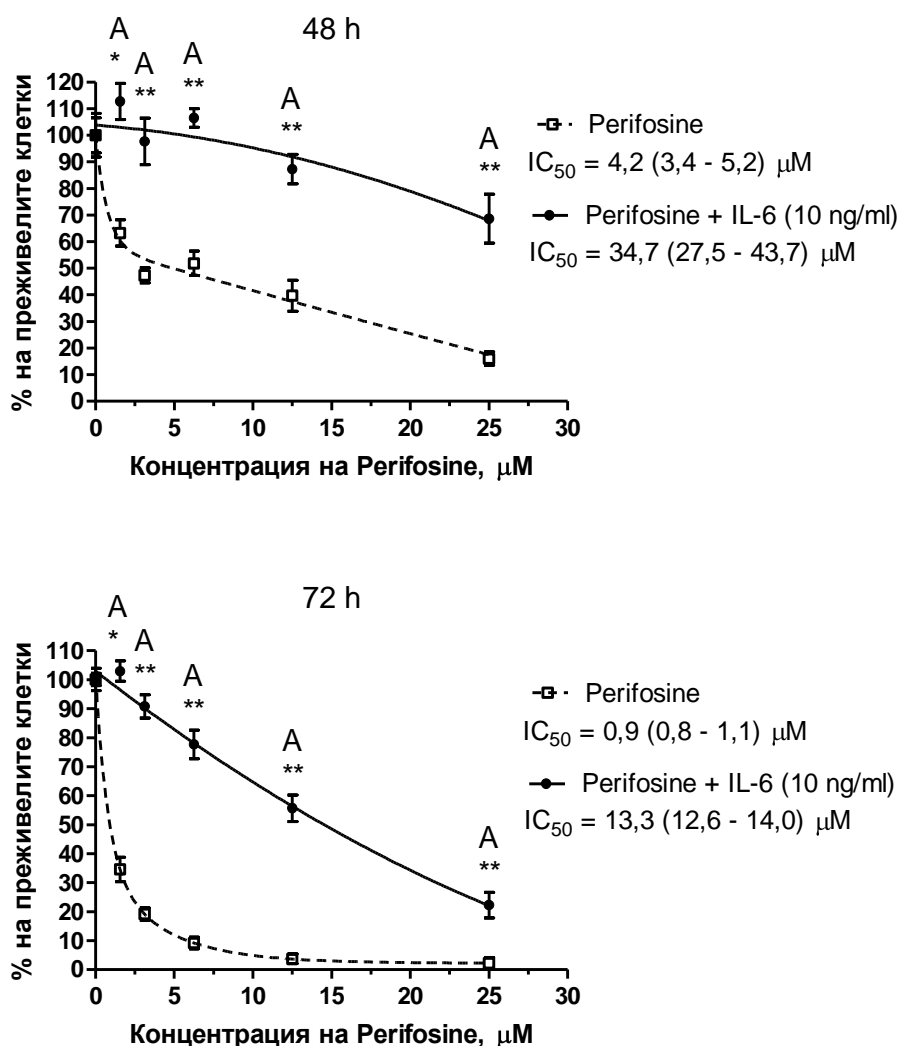


Получените резултати след едновременно въздействие с **Erufosine** и **IL-6** за **72 часа** са представени на фиг. IV.65. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки OPM-2, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. При концентрации 3,13, 6,25 и 12,5 μM Erufosine разликите са особено големи и отговарят на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки OPM-2 е: 99,6% след третиране с 3,13 μM еруфозин и 10 ng/ml IL-6 и 71,1% след третиране само с 3,13 μM еруфозин; 89,3% след третиране с 6,25 μM еруфозин и 10 ng/ml IL-6 и 27,6% след третиране само с 6,25 μM еруфозин; 61,3% след третиране с 12,5 μM еруфозин и 10 ng/ml IL-6 и 2,4% след третиране само с 12,5 μM еруфозин; $P < 0,01$ и за трите случая). $IC_{50(72h)}$ на Erufosine за клетъчната линия OPM-2 е 13,6 (13,1 - 14,2) μM в присъствие на IL-6 и 4,4 (4,2 - 4,5) μM в отсъствието му. При клетки U-266 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на еруфозина в присъствие на IL-6 ($P < 0,01$ при 25 μM Erufosine; $P < 0,05$ при 12,5 μM Erufosine). $IC_{50(72h)}$ на Erufosine за тази клетъчна линия е 16,1 (15,3 - 16,9) μM в присъствие на IL-6 и 13,9 (13,0 - 14,9) μM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-ниско от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 6,25 μM Erufosine ($P < 0,01$). $IC_{50(72h)}$ на Erufosine за клетъчната линия RPMI-8226 е 4,6 (4,5 - 4,8) μM в присъствие на IL-6 и 5,3 (5,2 - 5,4) μM в отсъствието му.

На фиг. IV.66. са представени получените резултати при едновременно приложение на **Perifosine** и **IL-6** върху клетки OPM-2 за 48 или 72 часа. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки, кривите, изразяващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация перифозин, лежат по-високо от съответните криви за нетретираните с IL-6 клетки. При всички приложени концентрации на Perifosine (от 1,56 до 25 μM) разликите са много големи и са изпълнени заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Така например на 48-ия час процентът на преживелите клетки е: 112,3% след третиране с 1,56 μM перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 63,3% след третиране само с 1,56 μM перифозин; 97,7% след третиране с 3,13 μM перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 47,4% след третиране само с 3,13 μM перифозин; 106,6% след третиране с 6,25 μM перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 51,9% след третиране само с 6,25 μM перифозин; 87,3% след третиране с 12,5 μM перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 39,7% след третиране само с 12,5 μM перифозин; 68,7% след третиране с 25 μM перифозин;

Фиг. IV.65. Влияние на IL-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 по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с еруфозин 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 IL-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.



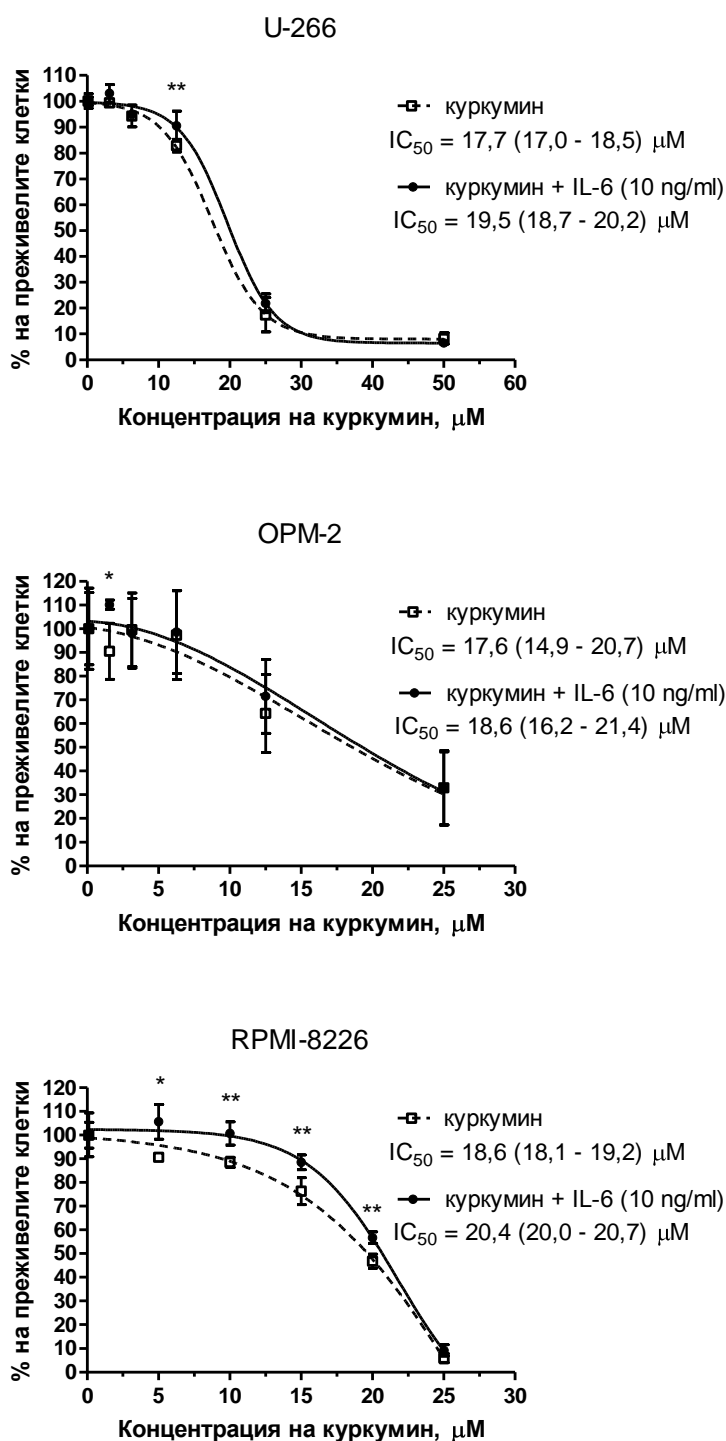


Фиг. IV.66. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Perifosine спрямо миеломната клетъчна линия OPM-2. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия (горната графика) или 72-ия час (долната графика) след еднократно третиране с Perifosine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с перифозин 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 IL-6 проба. Една звездичка отговаря на P < 0,05, а две – на 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.

фозин и 10 ng/ml IL-6 и 16,0% след третиране само с 25 μ M перифозин; $P < 0,01$ за всички случаи без първия, където $P < 0,05$). $IC_{50(48h)}$ на Perifosine за клетъчната линия ОРМ-2 е 34,7 (27,5 - 43,7) μ M в присъствие на IL-6 и 4,2 (3,4 - 5,5) μ M в отсъствието му. На 72-ия час процентът на преживелите клетки е: 102,9% след третиране с 1,56 μ M перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 34,6% след третиране само с 1,56 μ M перифозин; 90,8% след третиране с 3,13 μ M перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 19,2% след третиране само с 3,13 μ M перифозин; 77,7% след третиране с 6,25 μ M перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 9,2% след третиране само с 6,25 μ M перифозин; 55,7% след третиране с 12,5 μ M перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 3,8% след третиране само с 12,5 μ M перифозин; 22,3% след третиране с 25 μ M перифозин и 10 ng/ml IL-6 и 2,3% след третиране само с 25 μ M перифозин; $P < 0,01$ за всички случаи без първия, където $P < 0,05$). $IC_{50(72h)}$ на Perifosine за клетъчната линия ОРМ-2 е 13,3 (12,6 - 14,0) μ M в присъствие на IL-6 и 0,9 (0,8 - 1,1) μ M в отсъствието му.

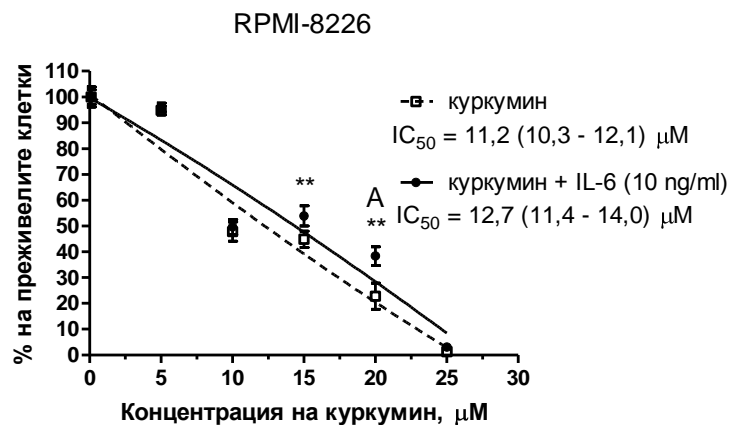
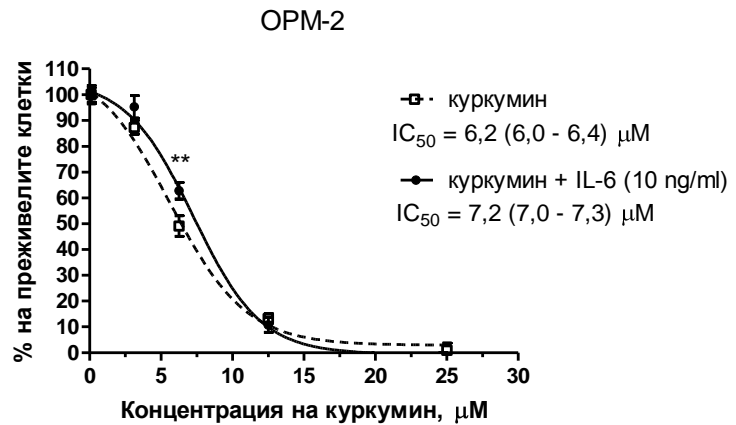
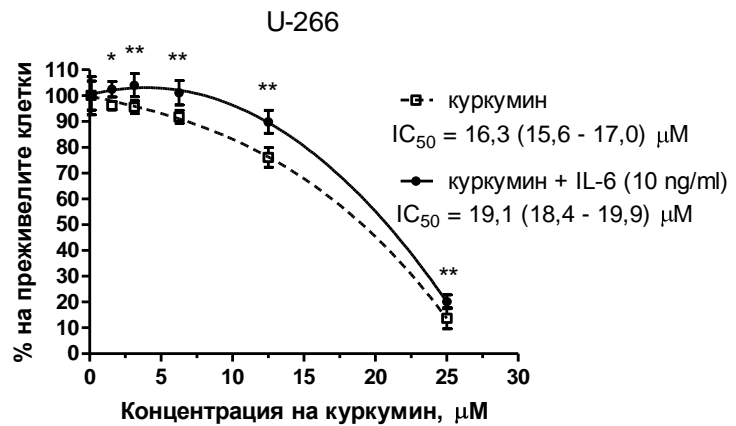
На фиг. IV.67. са представени получените резултати при едновременно приложение на **куркумин и IL-6 за 48 часа**. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. При концентрация 12,5 μ M разликата е статистически значима ($P < 0,01$). $IC_{50(48h)}$ на куркумина за клетъчната линия U-266 е 19,5 (18,7 - 20,2) μ M в присъствие на IL-6 и 17,7 (17,0 - 18,5) μ M в отсъствието му. При клетки ОРМ-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на куркумина в присъствие на IL-6 ($P < 0,05$ при 1,56 μ M куркумин). $IC_{50(48h)}$ на куркумина за тази клетъчна линия е 18,6 (16,2 - 21,4) μ M в присъствие на IL-6 и 17,6 (14,9 - 20,7) μ M в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 5, 10, 15 и 20 μ M куркумин ($P < 0,05$ в първия случай и $< 0,01$ в останалите три случая). $IC_{50(48h)}$ на куркумина за клетъчната линия RPMI-8226 е 20,4 (20,0 - 20,7) μ M в присъствие на IL-6 и 18,6 (18,1 - 19,2) μ M в отсъствието му.

Получените резултати след едновременно въздействие с **куркумин и IL-6 за 72 часа** са представени на фиг. IV.68. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при всички изследвани



Фиг. IV.67. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на куркумин спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с куркумин, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с куркумин 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

Фиг. IV.68. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на куркумин спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по MTT-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с куркумин, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с куркумин 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 IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация куркумин) е означено с буквата А.

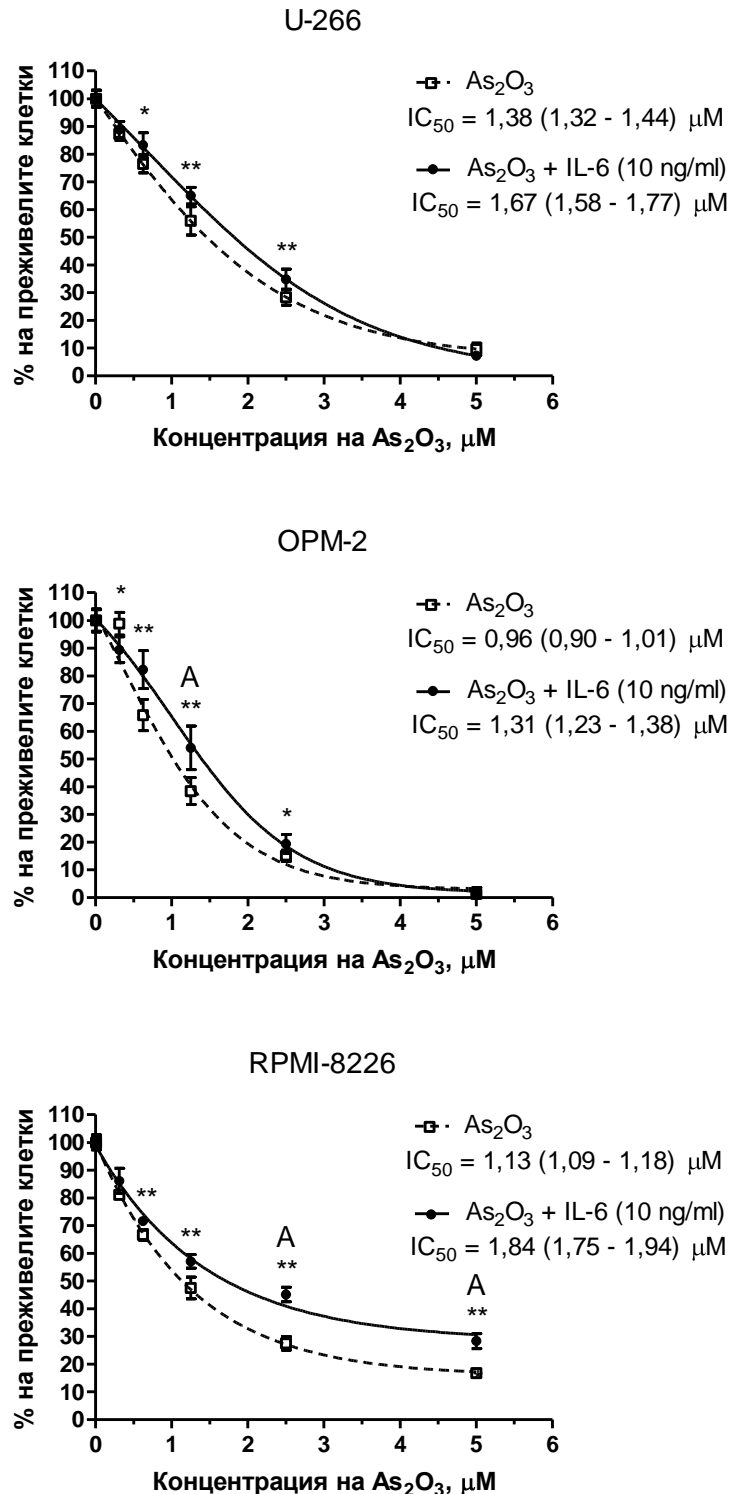


концентрации ($P < 0,05$ при $1,56 \mu\text{M}$ куркумин и $< 0,01$ при $3,13, 6,25, 12,5$ и $25 \mu\text{M}$ куркумин). $IC_{50(72h)}$ на куркумина за клетъчната линия U-266 е $19,1 (18,4 - 19,9) \mu\text{M}$ в присъствие на IL-6 и $16,3 (15,6 - 17,0) \mu\text{M}$ в отсъствието му. При клетки RPM-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на куркумина в присъствие на IL-6 ($P < 0,01$ при $6,25 \mu\text{M}$ куркумин). $IC_{50(72h)}$ на куркумина за тази клетъчна линия е $7,2 (7,0 - 7,3) \mu\text{M}$ в присъствие на IL-6 и $6,2 (6,0 - 6,4) \mu\text{M}$ в отсъствието му. Също и при третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 15 и $20 \mu\text{M}$ куркумин ($P < 0,01$), като във втория случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е $38,3\%$ в присъствие на IL-6 и $22,8\%$ в отсъствието му. $IC_{50(72h)}$ на куркумина за клетъчната линия RPMI-8226 е $12,7 (11,4 - 14,0) \mu\text{M}$ в присъствие на IL-6 и $11,2 (10,3 - 12,1) \mu\text{M}$ в отсъствието му.

На фиг. IV.69. са представени получените резултати при едновременно приложение на As_2O_3 и IL-6 за 48 часа. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация As_2O_3 , лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при $0,63, 1,25$ и $2,5 \mu\text{M}$ As_2O_3 ($P < 0,05$ в първия случай и $< 0,01$ в останалите два случая). $IC_{50(48h)}$ на As_2O_3 за клетъчната линия U-266 е $1,67 (1,58 - 1,77) \mu\text{M}$ в присъствие на IL-6 и $1,38 (1,32 - 1,44) \mu\text{M}$ в отсъствието му. При клетки RPM-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на диарсеновия триоксид в присъствие на IL-6 ($P < 0,05$ при $0,31$ и $2,5 \mu\text{M}$ As_2O_3 ; $P < 0,01$ при $0,63$ и $1,25 \mu\text{M}$ As_2O_3). Разликата при $1,25 \mu\text{M}$ As_2O_3 е по-голяма и отговаря на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е $54,0\%$ в присъствие на IL-6 и $38,4\%$ в отсъствието му. $IC_{50(48h)}$ на As_2O_3 за тази клетъчна линия е $1,31 (1,23 - 1,38) \mu\text{M}$ в присъствие на IL-6 и $0,96 (0,90 - 1,01) \mu\text{M}$ в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация As_2O_3 , лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при $0,63, 1,25, 2,5$ и $5 \mu\text{M}$ As_2O_3 ($P < 0,01$), като в последните два случая разликата е по-голяма и са изпълнени заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в тези случаи е: $45,1\%$ след третиране с $2,5 \mu\text{M}$ As_2O_3 и 10 ng/ml IL-6 и $27,5\%$ след

третиране само с 2,5 μM As_2O_3 ; 28,3% след третиране с 5 μM As_2O_3 и 10 ng/ml IL-6 и 16,8% след третиране само с 5 μM As_2O_3 . $\text{IC}_{50(48\text{h})}$ на диарсеновия триоксид за клетъчната линия RPMI-8226 е 1,84 (1,75 - 1,94) μM в присъствие на IL-6 и 1,13 (1,09 - 1,18) μM в отсъствието му.

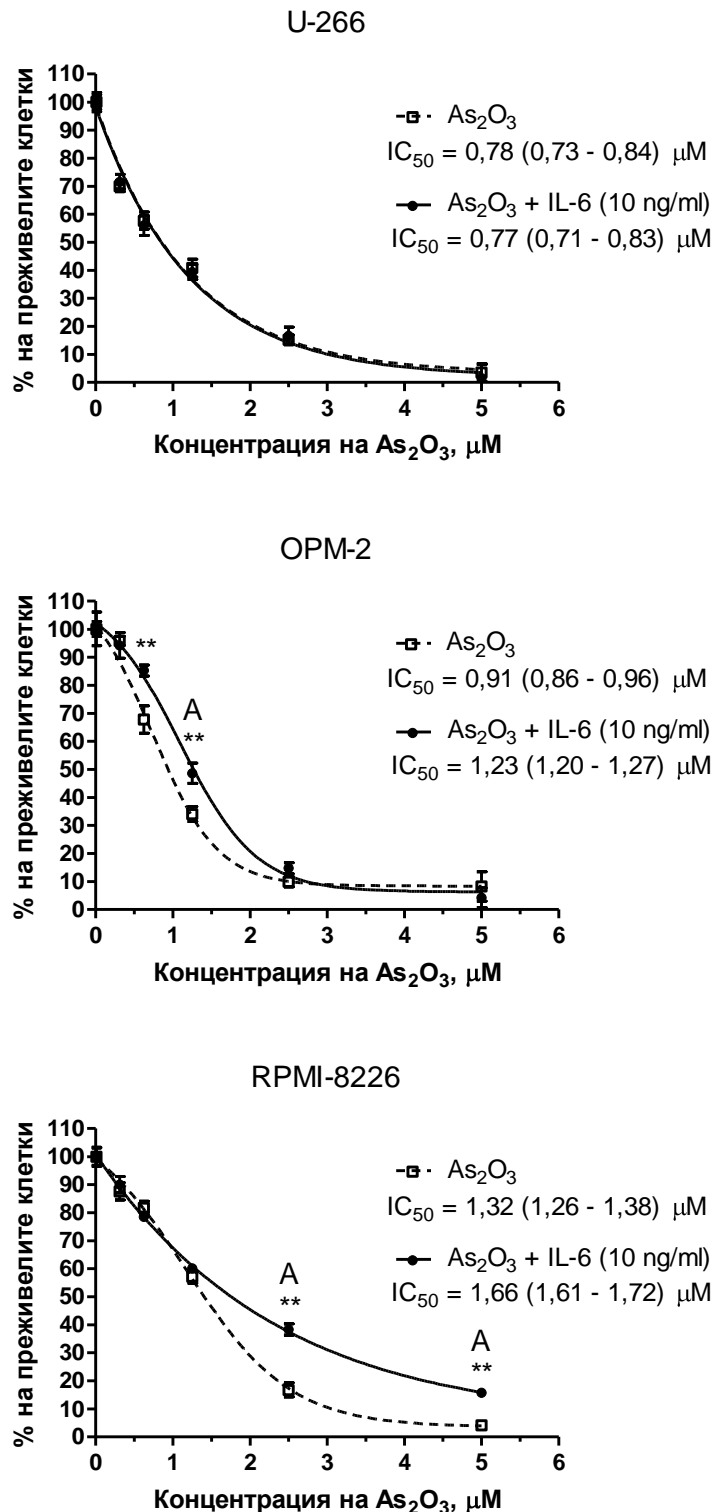
Фиг. IV.69. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на As_2O_3 спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mostaши, на 48-ия час след еднократно третиране с As_2O_3 , приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с диарсенов триоксид 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация As_2O_3) е означено с буквата А.

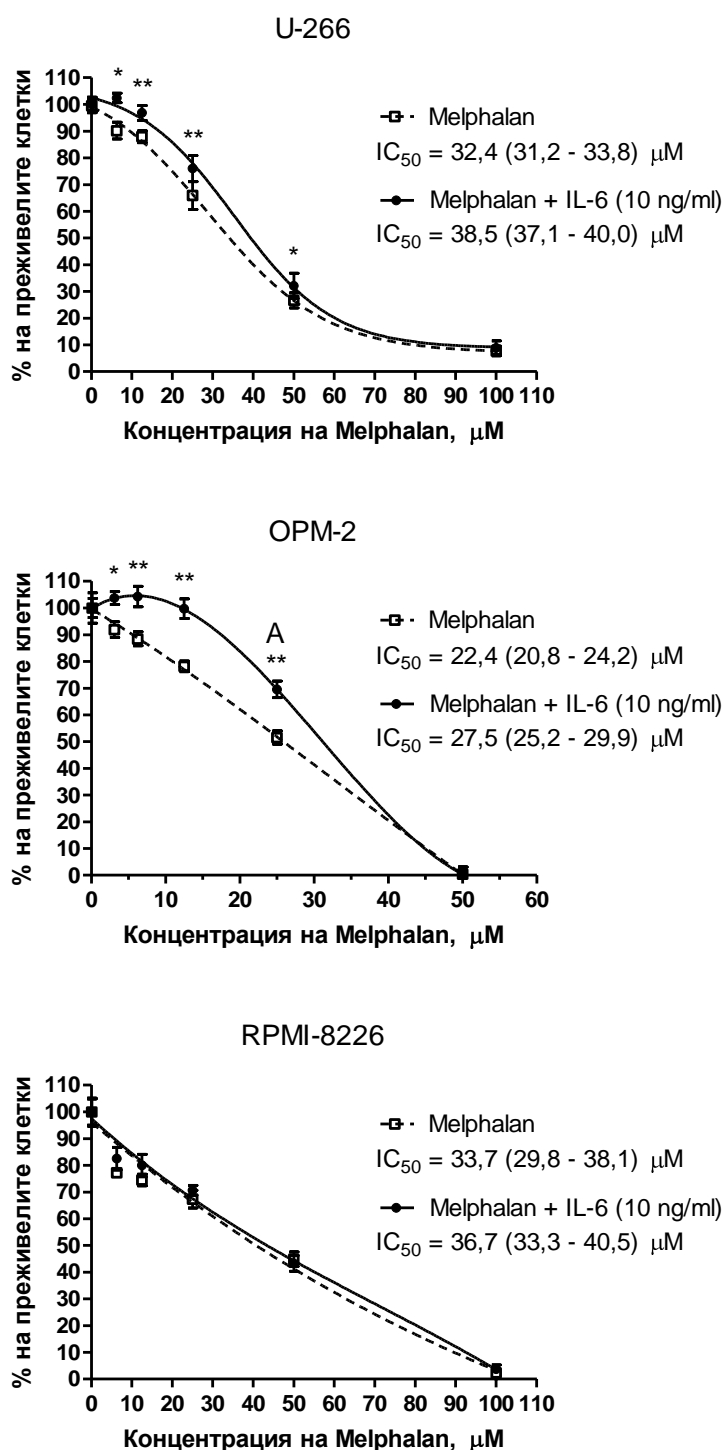


Получените резултати след едновременно въздействие с **As₂O₃** и **IL-6** за **72 часа** са представени на фиг. IV.70. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки OPM-2, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация As₂O₃, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 0,625 и 1,25 µM As₂O₃ (P < 0,01), като във втория случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е 48,7% в присъствие на IL-6 и 34,0% в отсъствието му. IC_{50(72h)} на As₂O₃ за клетъчната линия OPM-2 е 1,23 (1,20 - 1,27) µM в присъствие на IL-6 и 0,91 (0,86 - 0,96) µM в отсъствието му. При клетки RPMI-8226 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на диарсеновия триоксид в присъствие на IL-6 (P < 0,01 при 2,5 и 5 µM As₂O₃). Разликите са големи и са изпълнени заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки е: 38,3% след третиране с 2,5 µM As₂O₃ и 10 ng/ml IL-6 и 16,8% след третиране само с 2,5 µM As₂O₃; 15,7% след третиране с 5 µM As₂O₃ и 10 ng/ml IL-6 и 4,2% след третиране само с 5 µM As₂O₃. IC_{50(72h)} на As₂O₃ за клетъчната линия RPMI-8226 е 1,66 (1,61 - 1,72) µM в присъствие на IL-6 и 1,32 (1,26 - 1,38) µM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация As₂O₃, се припокрива със съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки, т.е. в случая IL-6 не повлиява цитотоксичния ефект на диарсеновия триоксид. IC_{50(72h)} на As₂O₃ за тази клетъчна линия е 0,77 (0,71 - 0,83) µM в присъствие на IL-6 и 0,78 (0,73 - 0,84) µM в отсъствието му.

На фиг. IV.71. са представени получените резултати при едновременно приложение на **Melphalan** и **IL-6** за **48 часа**. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация мелфалан, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 6,25, 12,5, 25 и 50 µM Melphalan (P < 0,05 в първия и последния случай и < 0,01 в останалите два случая). IC_{50(48h)} на Melphalan за клетъчната линия U-266 е 38,5 (37,1 - 40,0) µM в присъствие на IL-6 и 32,4 (31,2 - 33,8) µM в отсъствието му. При клетки OPM-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на мелфалана в присъствие на IL-6 (P < 0,05 при 3,13 µM Melphalan; P < 0,01 при 6,25, 12,5 и 25 µM Melphalan). Разликата при 25 µM мелфалан е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е 69,6% в присъст-

Фиг. IV.70. Влияние на ИЛ-6 върху цитотоксичната ефективност на As_2O_3 спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с As_2O_3 , приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml ИЛ-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с диарсенов триоксид 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 значима разлика ($P < 0,01$) спрямо съответната нетретирана с ИЛ-6 проба. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация As_2O_3) е означено с буквата А.



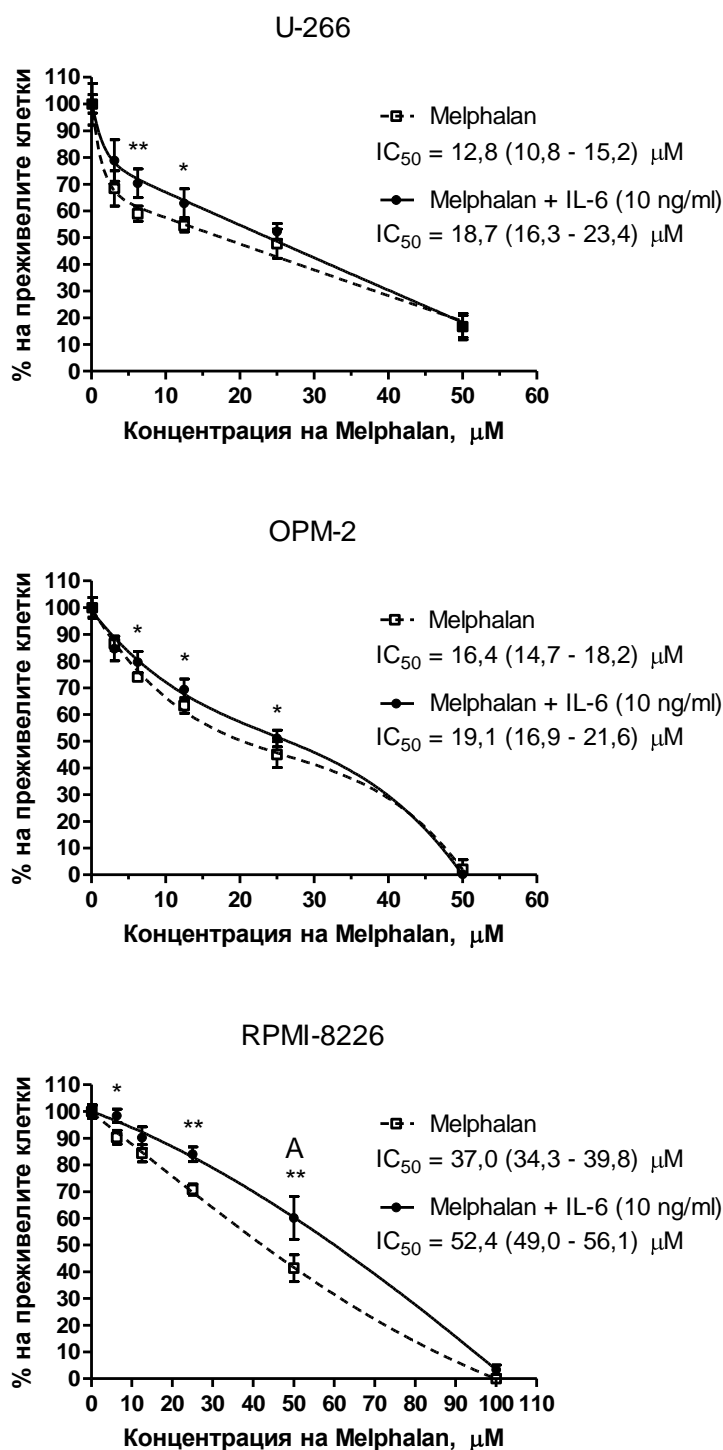


Фиг. IV.71. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Melphalan, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с мелфалан 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Melphalan) е означено с буквата А.

вие на IL-6 и 51,6% в отсъствието му. $IC_{50(48h)}$ на Melphalan за клетъчната линия OPM-2 е 27,5 (25,2 - 29,9) μM в присъствие на IL-6 и 22,4 (20,8 - 24,2) μM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация Melphalan, се припокрива със съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки, т.е. в случая IL-6 не повлиява цитотоксичния ефект на мелфалана. $IC_{50(48h)}$ на Melphalan за тази клетъчна линия е 36,7 (33,3 - 40,5) μM в присъствие на IL-6 и 33,7 (29,8 - 38,1) μM в отсъствието му.

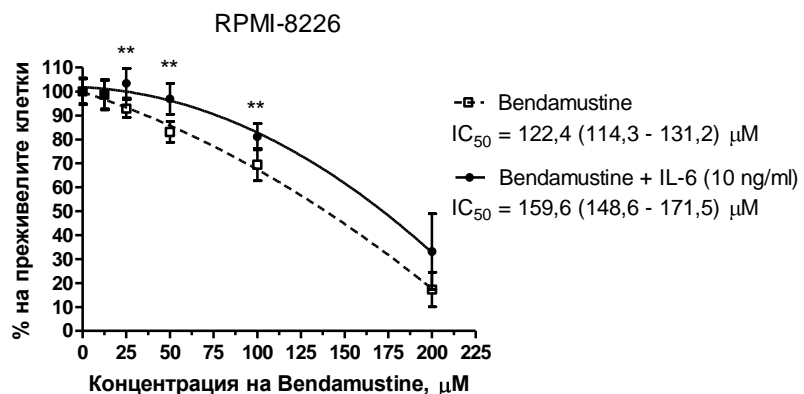
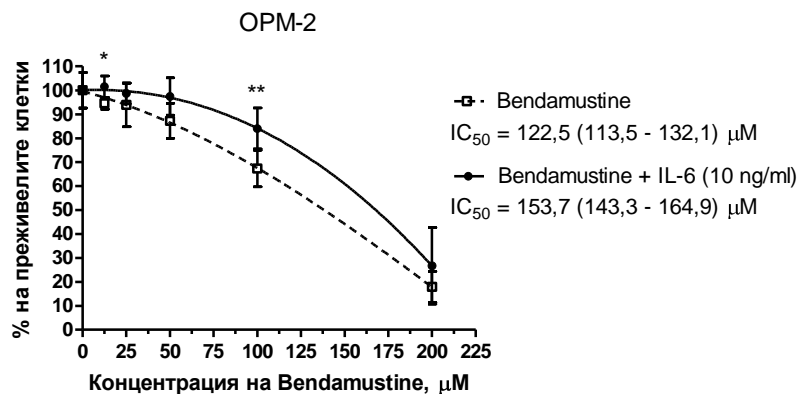
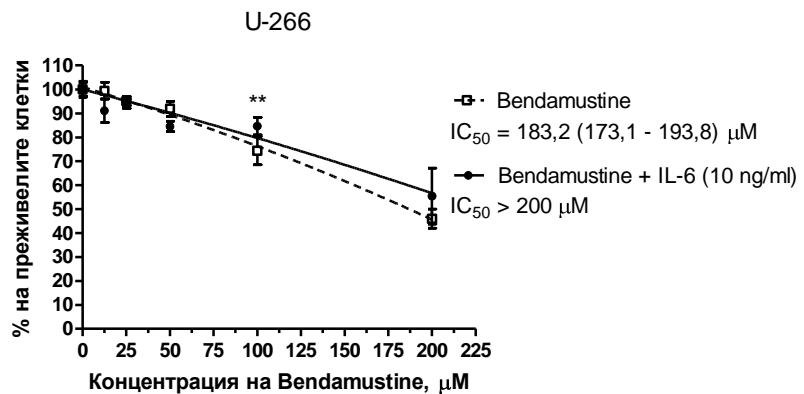
Получените резултати след едновременно въздействие с **Melphalan и IL-6 за 72 часа** са представени на фиг. IV.72. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация мелфалан, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 6,25 и 12,5 μM Melphalan ($P < 0,01$ в първия случай и $< 0,05$ във втория). $IC_{50(72h)}$ на Melphalan за клетъчната линия U-266 е 18,7 (16,3 - 23,4) μM в присъствие на IL-6 и 12,8 (10,8 - 15,2) μM в отсъствието му. При клетки OPM-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на мелфалана в присъствие на IL-6 ($P < 0,05$ при 6,25, 12,5 и 25 μM Melphalan). $IC_{50(72h)}$ на Melphalan за тази клетъчна линия е 19,1 (16,9 - 21,6) μM в присъствие на IL-6 и 16,4 (14,7 - 18,2) μM в отсъствието му. Също и при третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация мелфалан, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 6,25, 25 и 50 μM Melphalan ($P < 0,05$ в първия случай и $< 0,01$ в другите два), като в последния случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е 60,1% в присъствие на IL-6 и 41,3% в отсъствието му. $IC_{50(72h)}$ на Melphalan за клетъчната линия RPMI-8226 е 52,4 (49,0 - 56,1) μM в присъствие на IL-6 и 37,0 (34,3 - 39,8) μM в отсъствието му.

На фиг. IV.73. са представени получените резултати при едновременно приложение на **Bendamustine и IL-6 за 48 часа**. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бендамустин, лежи малко по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 100 μM бендамустин ($P < 0,01$). $IC_{50(48h)}$ на Bendamustine за клетъчната линия U-266 е над



Фиг. IV.72. Влияние на ИЛ-6 върху цитотоксичната ефективност на Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Melphalan, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml ИЛ-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с мелфалан 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 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 $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Melphalan) е означено с буквата А.

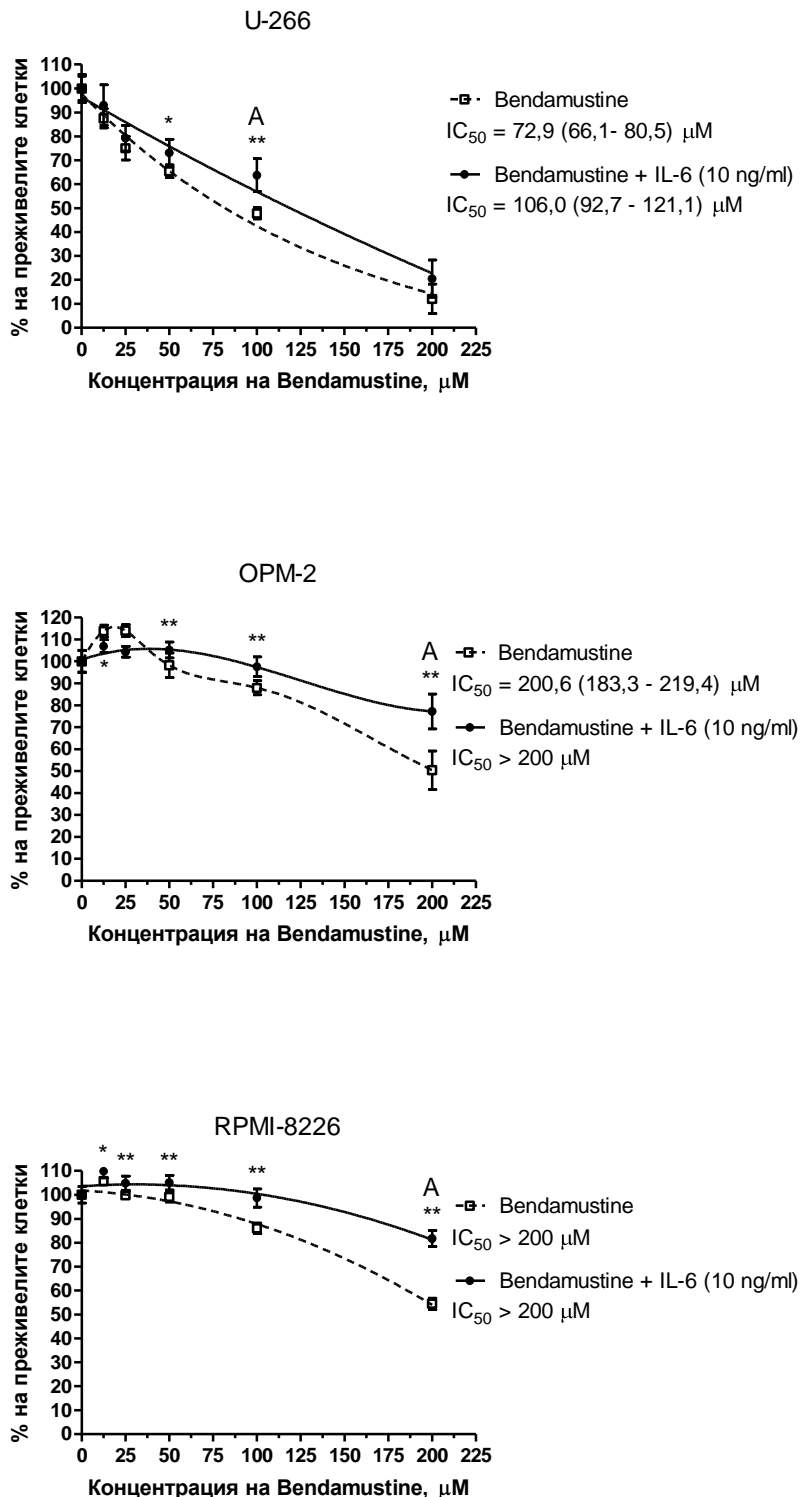
Фиг. IV.73. Влияние на ИЛ-6 върху цитотоксичната ефективност на Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Bendamustine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml ИЛ-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с бендамустин 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.



200 μM в присъствие на IL-6 и 183,2 (173,1 - 193,8) μM в отсъствието му. При клетки ОРМ-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на бендамустина в присъствие на IL-6 ($P < 0,05$ при 12,5 μM Bendamustine; $P < 0,01$ при 100 μM Bendamustine). $\text{IC}_{50(48\text{h})}$ на Bendamustine за тази клетъчна линия е 153,7 (143,3 - 164,9) μM в присъствие на IL-6 и 122,5 (113,5 - 132,1) μM в отсъствието му. Също и при третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бендамустин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 25, 50 и 100 μM Bendamustine ($P < 0,01$). $\text{IC}_{50(48\text{h})}$ на Bendamustine за клетъчната линия RPMI-8226 е 159,6 (148,6 - 171,5) μM в присъствие на IL-6 и 122,4 (114,3 - 131,2) μM в отсъствието му.

Получените резултати след едновременно въздействие с **Bendamustine и IL-6 за 72 часа** са представени на фиг. IV.74. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект от приложената концентрация бендамустин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 50 и 100 μM бендамустин ($P < 0,05$ в първия случай и $< 0,01$ във втория), като във втория случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в този случай е 63,8% в присъствие на IL-6 и 47,8% в отсъствието му. $\text{IC}_{50(72\text{h})}$ на Bendamustine за клетъчната линия U-266 е 106,0 (92,7 - 121,1) μM в присъствие на IL-6 и 72,9 (66,1 - 80,5) μM в отсъствието му. При клетки ОРМ-2 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на бендамустина в присъствие на IL-6 ($P < 0,01$ при 50, 100 и 200 μM Bendamustine). В случая с 200 μM Bendamustine са изпълнени заложените критерии за антагонистично взаимодействие, като процентът на преживелите клетки е 77,2% в присъствие на IL-6 и 50,5% в отсъствието му. В ниски концентрации (6,25 и 12,5 μM) бендамустинът стимулира пролиферацията на клетките, но IL-6 се противопоставя на този ефект ($P < 0,05$ при 6,25 μM Bendamustine). При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект от приложената концентрация бендамустин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при всички приложени концентрации ($P < 0,05$ при 12,5 μM Bendamustine; $P < 0,01$ при 25, 50, 100 и 200 μM Bendamustine). В последния случай (200 μM Bendamustine) разликата е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в случая е 81,7% в присъствие на IL-6 и 54,5% в отсъствието му.

Фиг. IV.74. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Bendamustine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Bendamustine, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с бендамустин 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 IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Bendamustine) е означено с буквата А.

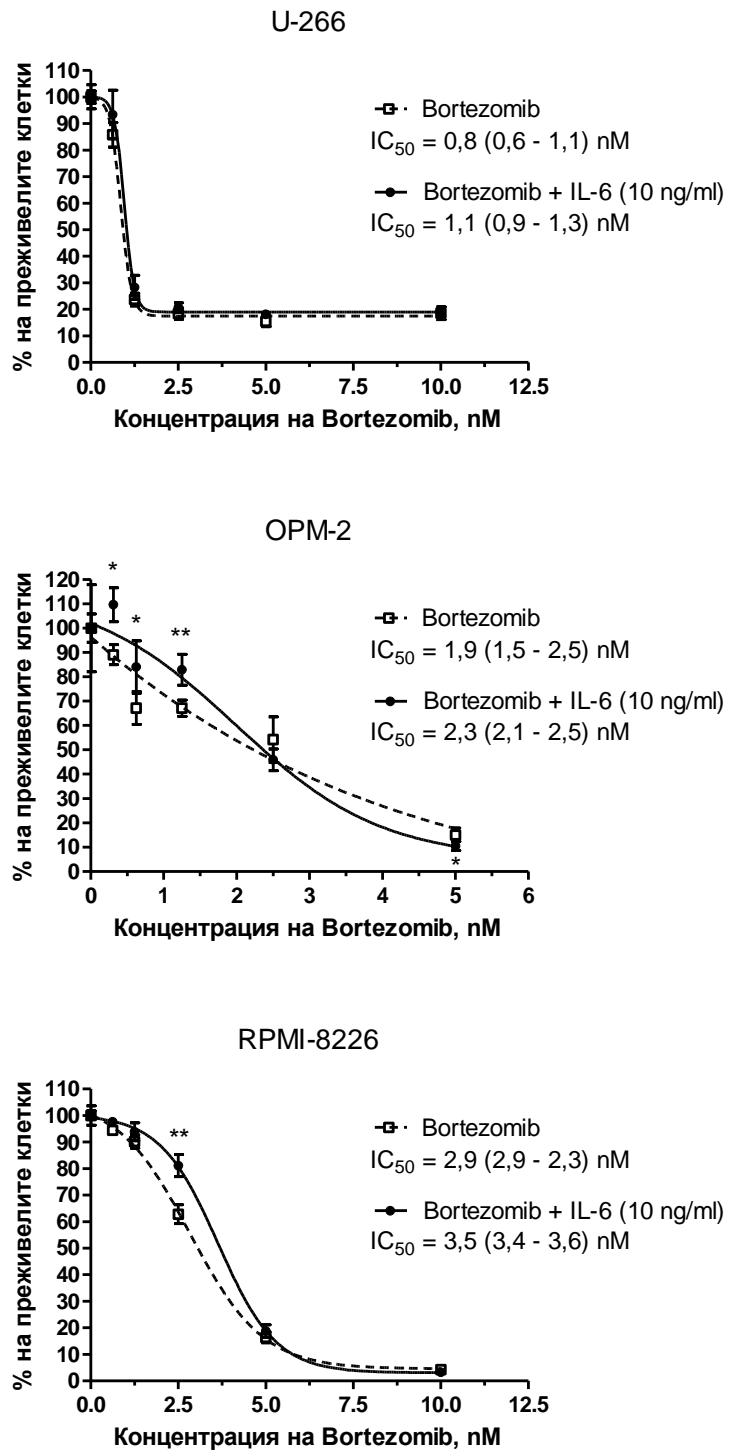


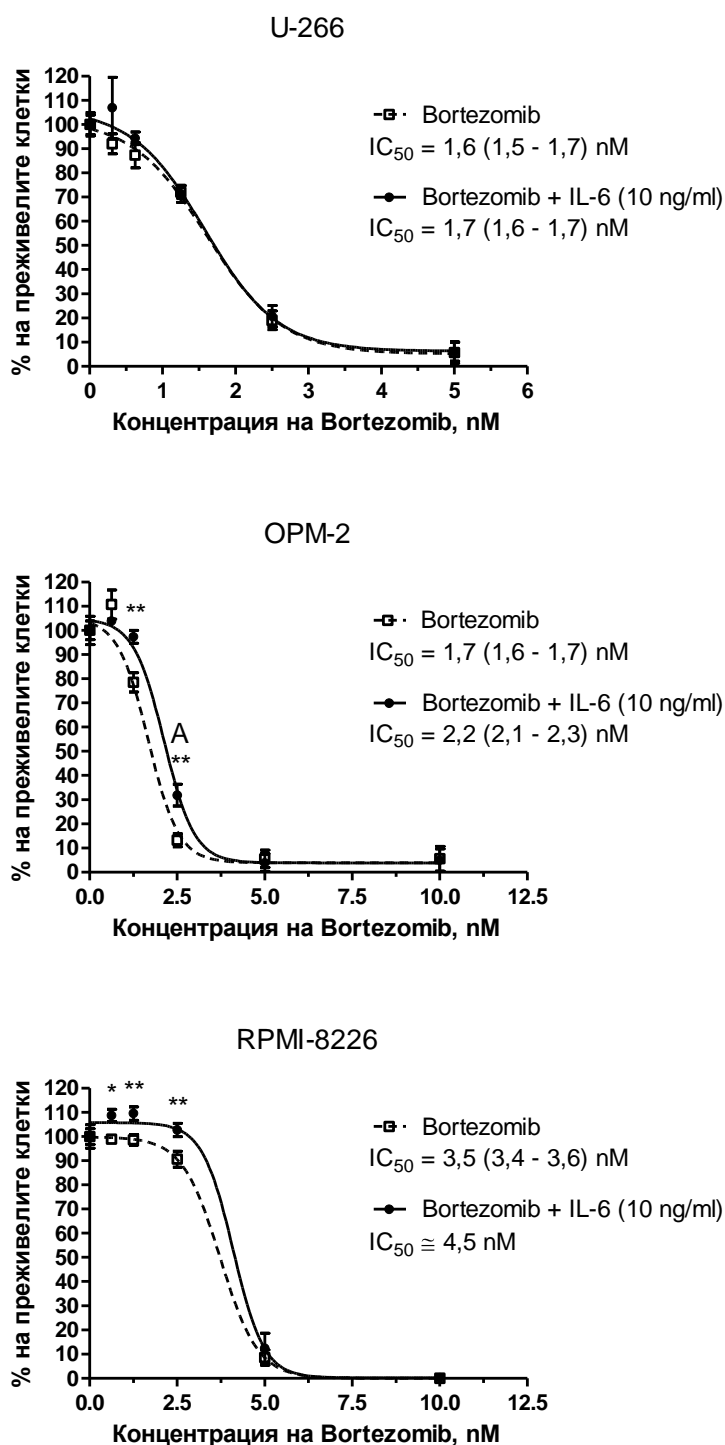
На фиг. IV.75. са представени получените резултати при едновременно приложение на **Bortezomib** и **IL-6** за **48 часа**. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бортезомиб, се припокрива със съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки, т.е. IL-6 не повлиява цитотоксичния ефект на бортезомиба. $IC_{50(48h)}$ на Bortezomib за тази клетъчна линия е 1,1 (0,9 - 1,3) nM в присъствие на IL-6 и 0,8 (0,6 - 1,1) nM в отсъствието му. При клетки OPM-2 се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на Bortezomib в присъствие на IL-6, когато бортезомибът е приложен в сравнително ниски концентрации ($P < 0,05$ при 0,31 и 0,63 nM Bortezomib; $P < 0,01$ при 1,25 nM Bortezomib), но комбинацията има по-голям цитотоксичен ефект в случая, когато бортезомибът е приложен във висока концентрация ($P < 0,05$ при 5 nM Bortezomib). $IC_{50(48h)}$ на Bortezomib за клетъчната линия OPM-2 е 2,3 (2,1 - 2,5) nM в присъствие на IL-6 и 1,9 (1,5 - 2,5) nM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бортезомиб, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 2,5 nM Bortezomib ($P < 0,01$). $IC_{50(48h)}$ на Bortezomib за клетъчната линия RPMI-8226 е 3,5 (3,4 - 3,6) nM в присъствие на IL-6 и 2,9 (2,9 - 3,0) nM в отсъствието му.

Получените резултати след едновременно въздействие с **Bortezomib** и **IL-6** за **72 часа** са представени на фиг. IV.76. Вижда се, че при третираните с IL-6 клетки OPM-2, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бортезомиб, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с IL-6 клетки. Разликата е статистически значима при 1,25 и 2,5 nM Bortezomib ($P < 0,01$), като във втория случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки в този случай е 31,9% в присъствие на IL-6 и 13,3% в отсъствието му. $IC_{50(72h)}$ на Bortezomib за клетъчната линия OPM-2 е 2,2 (2,1 - 2,3) nM в присъствие на IL-6 и 1,7 (1,6 - 1,7) nM в отсъствието му. При клетки RPMI-8226 също се наблюдава значително по-малък цитотоксичен ефект на бортезомиба в присъствие на IL-6 ($P < 0,05$ при 0,63 nM Bortezomib; $P < 0,01$ при 1,25 и 2,5 nM Bortezomib). $IC_{50(72h)}$ на Bortezomib за тази клетъчна линия е около 4,5 nM в присъствие на IL-6 и 3,5 (3,4 - 3,6) nM в отсъствието му. При третираните с IL-6 клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация бор-

тезомиб, се припокрива със съответната крива за нетретираниите с ИЛ-6 клетки, т.е. ИЛ-6 не повлиява цитотоксичния ефект на бортезомиба. $IC_{50(72h)}$ на Bortezomib за тази клетъчна линия е 1,7 (1,6 - 1,7) nM в присъствие на ИЛ-6 и 1,6 (1,5 - 1,7) nM в отсъствието му.

Фиг. IV.75. Влияние на ИЛ-6 върху цитотоксичната ефективност на Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Bortezomib, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml ИЛ-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с бортезомиб 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с ИЛ-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

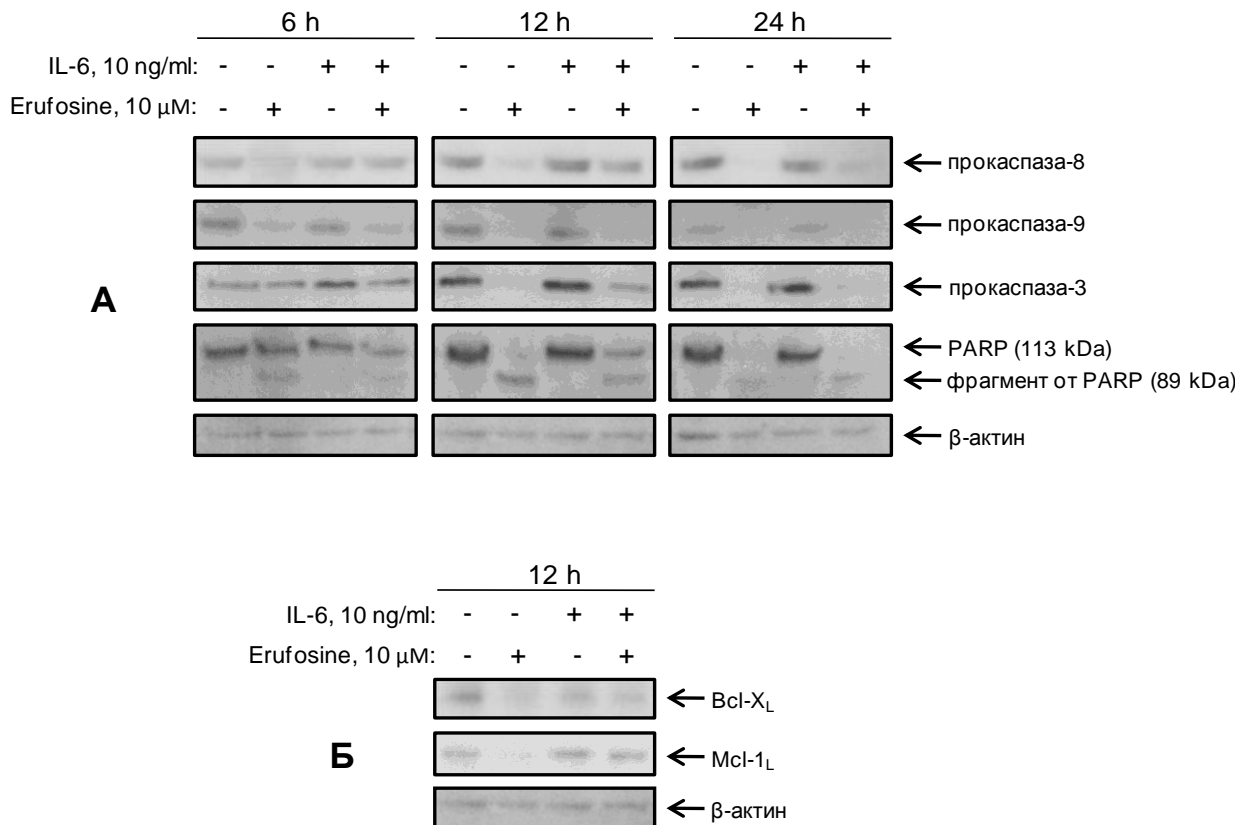




Фиг. IV.76. Влияние на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Bortezomib спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по MTT-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Bortezomib, приложен самостоятелно или едновременно с 10 ng/ml IL-6. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с бортезомиб 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 значима разлика спрямо съответната нетретирана с IL-6 проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на антагонизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\geq 1,3 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Bortezomib) е означено с буквата А.

Беше изследвано и влиянието на IL-6 върху способността на Erufosine да активира апоптотичните каскади в клетки OPM-2. Клетките бяха третирани едновременно с 10 ng/ml IL-6 и 10 μM Erufosine за 6, 12 или 24 часа, след което бяха изследвани чрез имуноблот за промени в нивата и активационния статус на различни каспази и PARP. Получените резултати са представени на фиг. IV.77.A (снимки на блотовете) и на таблица IV.7. (денситометрични данни). Данните показват, че самостоятелно приложен, еруфо-

зинът предизвиква понижение в нивата на неактивните прокаспазии-8, -9 и -3 и фрагментиране на PARP. Тези промени се забелязват още на 6-ия час и се засилват след по-дълго въздействие с еруфозин. Самостоятелно приложен, интерлевкинът не предизвиква значителни промени в активационния статус на каспазите и PARP, но инхибира способността на еруфозина да предизвиква такива промени. Това е най-забележимо при 12-часовите проби, където еруфозинът, приложен самостоятелно, свежда нивото на прокаспаза-8 до 20% от изходното, на прокаспазии-9 и -3 до 10% от изходното и предизвиква фрагментация на 92% от наличното количество PARP, докато в присъствие на IL-6 свежда нивото на прокаспаза-9 до 30% от изходното, на прокаспазии-8 и -3 до 40% от изходното и предизвиква фрагментация на 42% от наличното количество PARP.



Фиг. IV.77. Влияние на IL-6 върху способността на Erufosine да индуцира апоптоза при миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани само с еруфозин (10 μ M), само с интерлевкин-6 (10 ng/ml) или едновременно с еруфозин 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 (A), 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.

	6 h				12 h				24 h			
IL-6, 10 ng/ml	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Erufosine, 10 μ M	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Относително ниво на прокаспаза-8	1,0	0,8	1,0	0,9	1,0	0,1	1,2	0,4	1,0	0,05	1,2	0,2
Относително ниво на прокаспаза-9	1,0	0,3	0,7	0,4	1,0	0,2	1,2	0,3	1,0	0,1	1,0	0,1
Относително ниво на прокаспаза-3	1,0	0,8	1,3	0,8	1,0	0,2	1,0	0,4	1,0	0,05	1,2	0,2
Дял на неактивния фрагмент на PARP	0%	26%	0%	18%	0%	92%	0%	42%	0%	83%	7%	78%
Относително ниво на Vcl-X _L	-	-	-	-	1,0	0,5	0,7	0,6	-	-	-	-
Относително ниво на Mcl-1 _L	-	-	-	-	1,0	0,3	1,2	1,0	-	-	-	-

Таблица IV.7. Влияние на IL-6 върху способността на Erufosine да индуцира апоптоза при миеломни клетки OPM-2. Клетките са третирани само с еруфозин (10 μ M), само с интерлевкин-6 (10 ng/ml) или едновременно с еруфозин и интерлевкин-6, за период от 6, 12 или 24 часа, след което са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за прокаспазите и за антиапоптотичните протеини Vcl-X_L и Mcl-1_L са разделени на съответните интензитети за контролния протеин β -актин. Получените съотношения при нетретирани контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите. Делът на неактивния фрагмент на PARP е изчислен като процент от общото количество PARP чрез съпоставка на интензитетите на съответните бандове.

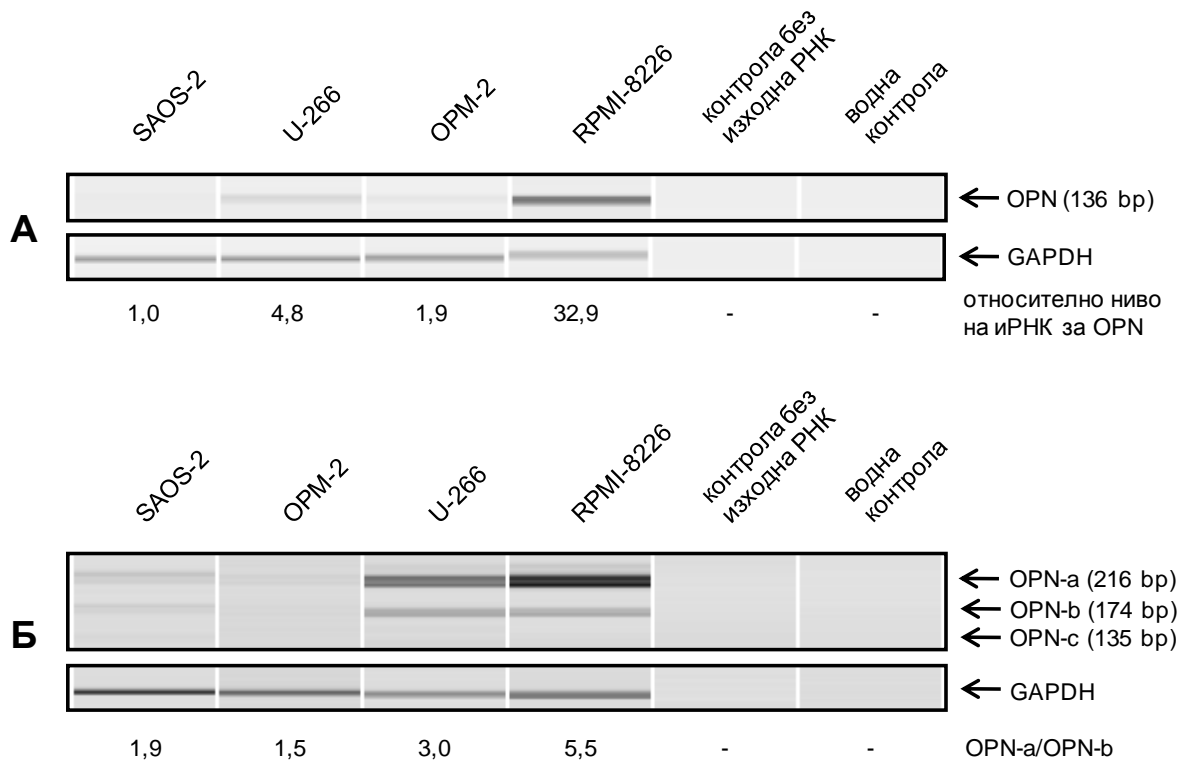
В 12-часовите проби допълнително бяха изследвани нивата на антиапоптотичните протеини Vcl-X_L и Mcl-1_L. Получените резултати са представени на фиг. IV.77.Б (снимки на блотовете) и на таблица IV.7. (денситометрични данни). Вижда се, че самостоятелно приложен, еруфозинът понижава нивата на Vcl-X_L и Mcl-1_L съответно 2 и 3,3 пъти. IL-6 не предизвиква значителни промени самостоятелно, но потиска ефекта на еруфозина – след съвместно приложение нивото на Vcl-X_L се понижава около 1,7 пъти, а това на Mcl-1_L не се променя.

Получените данни представят IL-6 като ключов фактор, обуславящ химиорезистентността и блокирането на апоптотичните механизми на миеломните клетки. В отделни случаи присъствието на IL-6 води до значителна загуба на химиочувствителност към алкилфосфохолини. Това влияние на IL-6 е по-слабо по отношение на Erufosine и по-силно по отношение на Perifosine. Споменатите промени в химиочувствителността се съпровождат от отслабване на способността на еруфозина да активира прокаспазите-8, -9

и -3 и съответно да предизвиква разграждане на PARP и на антиапоптоични протеини като Bcl-X_L и Mcl-1_L.

3.2. Влияние на остеопонтин (OPN)

Преди да се изследва влиянието на остеопонтина върху противомиеломния ефект на изследваните вещества, беше направена съпоставка чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на OPN в нетретирани клетки U-266, OPM-2, RPMI-8226 и SAOS-2. Получените резултати са представени на фиг. IV.78.A. Вижда се, че с най-високо ниво на иРНК за



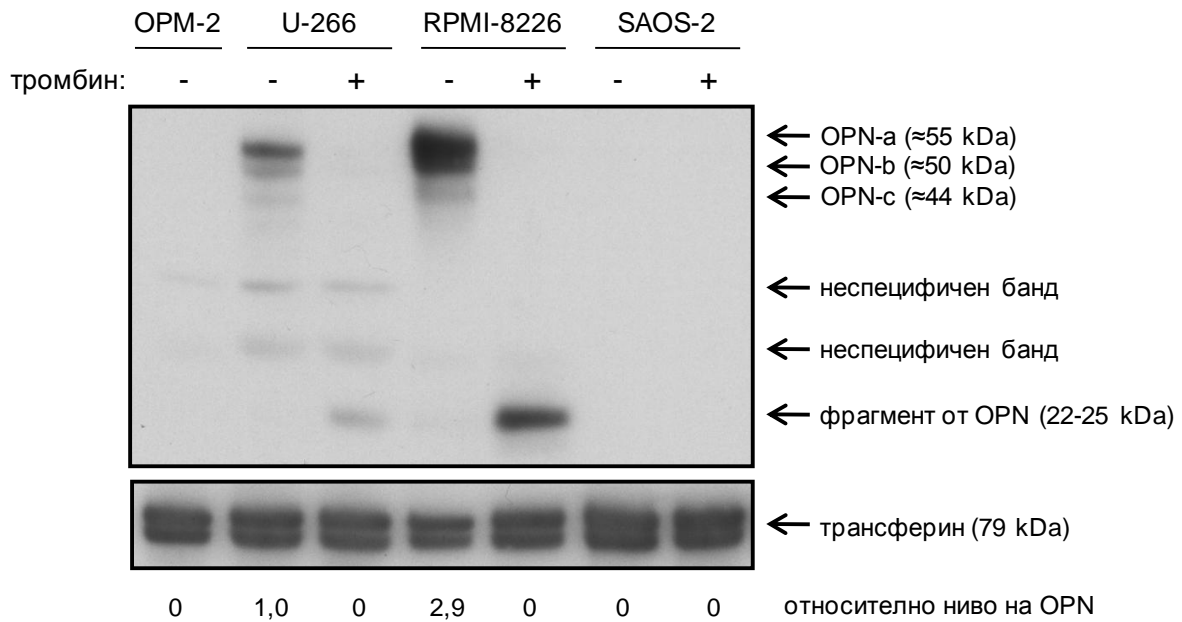
Фиг. IV.78. Сравнение чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на остеопонтин (OPN) в миеломните клетъчни линии OPM-2, U-266 и RPMI-8226 и в остеосаркомната SAOS-2. Използвани са два различни чифта праймери за амплификация на участъци от кДНК за синтез на OPN. Първият чифт води до получаване на един и същ продукт, независимо от това кой от трите известни транскрипта на гена за остеопонтин е послужил за субстрат (А). Вторият чифт води до получаване на различни по дължина продукти за отделните изоформи (Б). Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции е проконтролирано чрез паралелни PCR със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH). Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на иРНК за остеопонтин в отделните проби.

синтез на OPN се характеризира миеломната клетъчна линия RPMI-8226 – 32,9 пъти по-високо, отколкото при остеосаркомната клетъчна линия SAOS-2 и 17,3 пъти по-високо, отколкото при миеломната клетъчна линия OPM-2. Третата миеломна клетъчна линия (U-266) заема междинно положение с 2,5 пъти повече иРНК за синтез на остеопонтин от OPM-2 и 6,9 пъти по-малко от RPMI-8226. В допълнение бяха изследвани съотношенията между отделните сплайсингови форми на иРНК за синтез на OPN. Получените резултати са представени на фиг. IV.78.Б. Вижда се, че във всички случаи иРНК за синтез на OPN-a е в по-голямо количество от иРНК за синтез на OPN-b. Съотношението между нивата на двете форми е най-голямо при RPMI-8226, където то е 5,5. Следват U-266, SAOS-2 и OPM-2, при които съотношението е съответно 3,0, 1,9 и 1,5. В никоя от изследваните клетъчни линии не се установява значително количество иРНК за синтез на OPN-c.

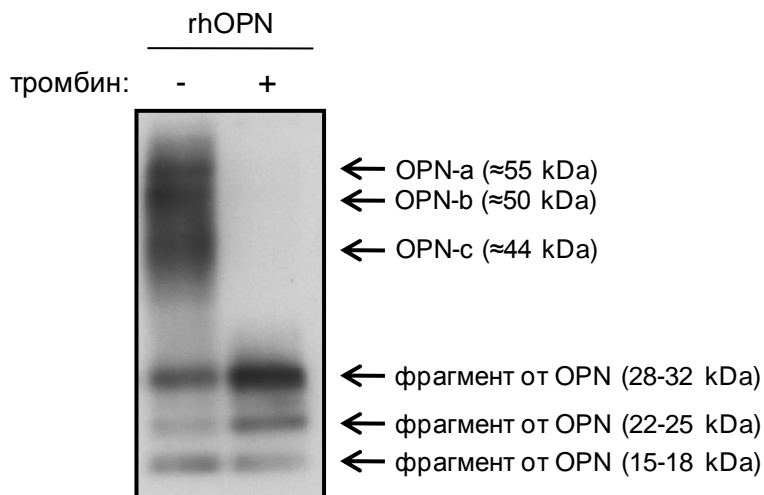
Беше изследвана сравнително и секрецията на OPN от отделните клетъчни линии. За целта беше проведен имуноблот с проби от концентрирана кондиционирана среда. Част от пробите бяха обработени с тромбин, за да се установят с висока степен на достоверност бандовете на остеопонтин по настъпващата специфична фрагментация. Получените резултати са представени на фиг. IV.79. Секретираният остеопонтин се наблюдава в средата на клетки RPMI-8226 и U-266, но не и в средата на клетки OPM-2 или SAOS-2. RPMI-8226 секретират 2,9 пъти по-голямо количество OPN от U-266. И двата вида клетки секретират в най-голямо количество изоформата OPN-a (≈ 55 kDa), в по-малко – OPN-b (≈ 50 kDa), а в най-малко – OPN-c (≈ 44 kDa).

3.2.1. Влияние на добавен рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN)

Най-напред, доставеният rhOPN беше подложен на анализ чрез имуноблот, за да се установи качественият му състав, т.е. дали съдържа различни изоформи. Получените резултати са представени на фиг. IV.80. Наблюдава се един много широк банд, което говори за присъствие в продукта на множество различни остеопонтинови форми. Специфичността на използваното антитяло се демонстрира от изчезването на въпросния банд и появата на специфични фрагменти, когато пробата е обработена с тромбин преди провеждане на електрофорезата. Остеопонтинови фрагменти се наблюдават в по-малко количество и в необработената с тромбин проба.

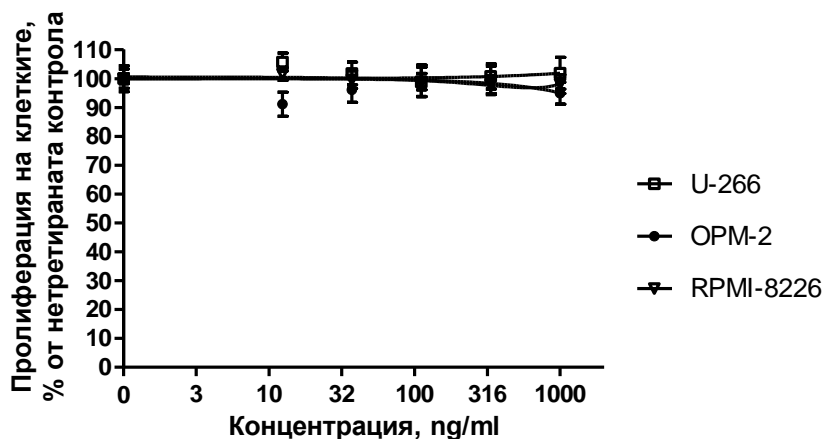


Фиг. IV.79. Сравнение на количествата остеопонтин (OPN), секретирани от клетки OPM-2, U-266, RPMI-8226 и SAOS-2 в хранителната им среда. Клетките са отглеждани в продължение на 3 дни в безсерумна среда Opti-MEM®, след което от средата е извлечен протеинов концентрат. Той е подложен на денатурация и е анализиран чрез имуноблот. Част от пробите са обработени с тромбин преди денатурирането, за да се наблюдава специфичното фрагментиране на остеопонтина. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на количествата трансферин (произхождащ от хранителната среда) в отделните проби. Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на остеопонтина.

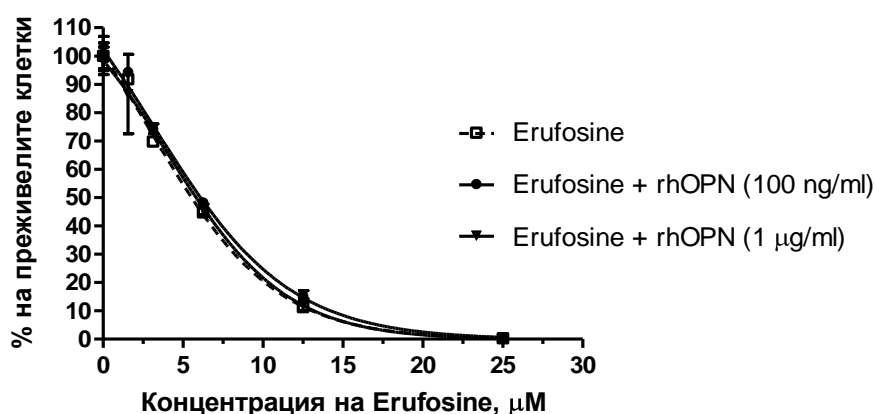


Фиг. IV.80. Анализ на качествения състав на рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN) от фирмата EMP Genetech. Две проби по 1 µg са изследвани чрез имуноблот, като едната е предварително обработена с тромбин, за да се наблюдава специфичното фрагментиране на остеопонтина.

Беше изследвано влиянието на самостоятелно приложен rhOPN върху пролиферационната активност на миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. rhOPN беше прилаган в концентрации между 10 и 1 000 ng/ml, при време на въздействие 72 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.81. Не се наблюдават никакви промени в пролиферационната активност на клетките.



Фиг. IV.81. Липса на влияние на рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN) върху пролиферацията на миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Степента на пролиферация на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с rhOPN. Процентите на пролиферация в третираните проби са изчислени спрямо съответните нетретиранни контроли, приети за 100%. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.



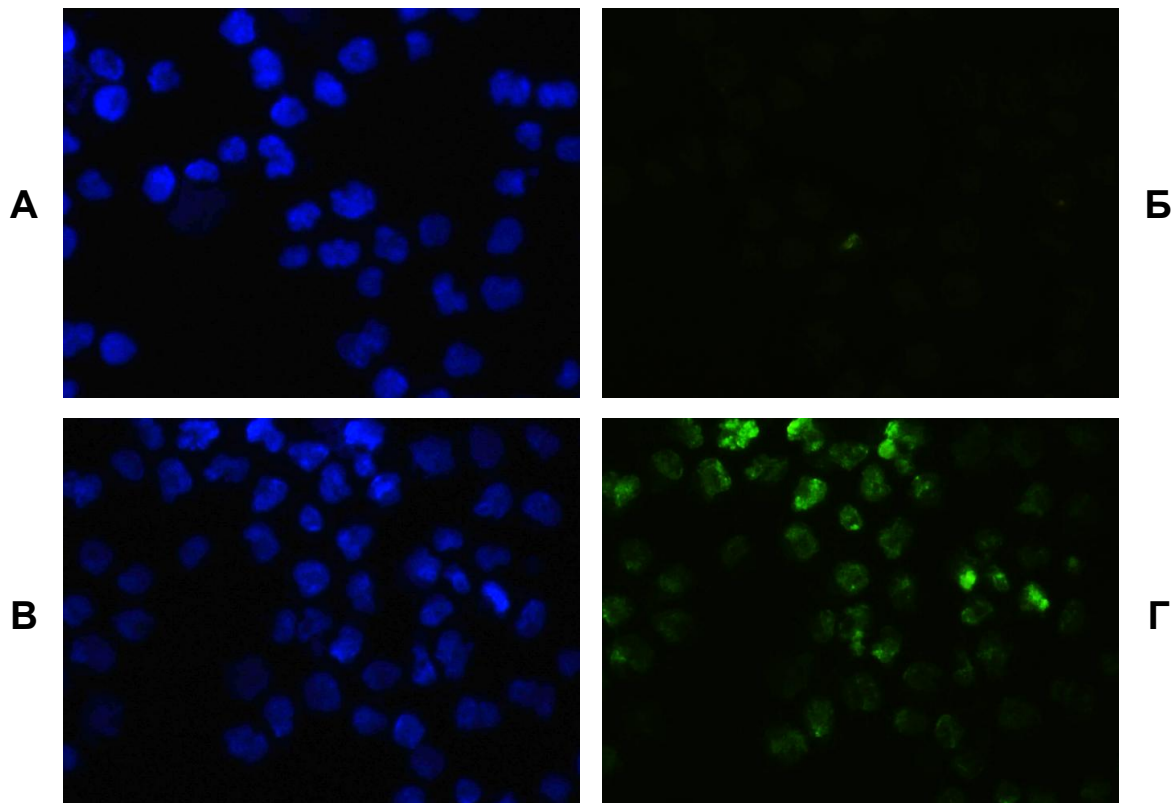
Фиг. IV.82. Липса на влияние на рекомбинантен човешки остеопонтин (rhOPN) върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломната клетъчна линия OPM-2. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с rhOPN (100 или 1 000 ng/ml). Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с еруфозин контрола, приета за 100%. Представените графики са получени след нелинеен регресионен анализ. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

На фиг. IV.82. са представени получените резултати за цитотоксичните ефекти след едновременно третиране на клетки OPM-2 с rhOPN и Erufosine. Вижда се, че кривите, изразяващи зависимостта на цитотоксичния ефект от приложената концентрация еруфозин, имат един и същ ход независимо от това дали клетките са третирани само с еруфозин или едновременно с еруфозин и rhOPN (100 ng/ml или 1 µg/ml), т.е. rhOPN не повлиява цитотоксичния ефект на еруфозина.

3.2.2. Влияние на потиснатата или стимулирана продукция на остеопонтин от клетките

Най-напред бяха проучени възможностите за успешно трансфектиране на клетки от трите миеломни клетъчни линии и на остеосаркомни клетки SAOS-2. За целта клетките бяха подложени на трансфекция с флуоресциращ олигонуклеотид Block-iT™, като бяха изпробвани два различни трансфектиращи реагента – Lipofectamine™ 2000 и TurboFect™. При U-266 и RPMI-8226 не бяха постигнати задоволителни резултати – успешно трансфектираните клетки бяха под 10%. Тези резултати наложиха изоставяне на плановете за потискане на продукцията на OPN в тези клетки чрез трансфекция с антисенс олигонуклеотиди или интерфериращи РНКи, насочени срещу иРНК за синтез на OPN. При OPM-2 и SAOS-2 обаче беше постигната задоволителна степен на трансфекция, като Lipofectamine™ 2000 се оказа малко по-ефективен от TurboFect™. Успешна трансфекция на клетки OPM-2 при използване на Lipofectamine™ 2000 е демонстрирана на фиг. IV.83. Вижда се, че повечето клетки от тези на снимка В са успешно трансфектирани, тъй като флуоресцират в зелено на снимка Г. Контролните нетрансфектирани клетки не флуоресцират в зелено (снимки А и Б).

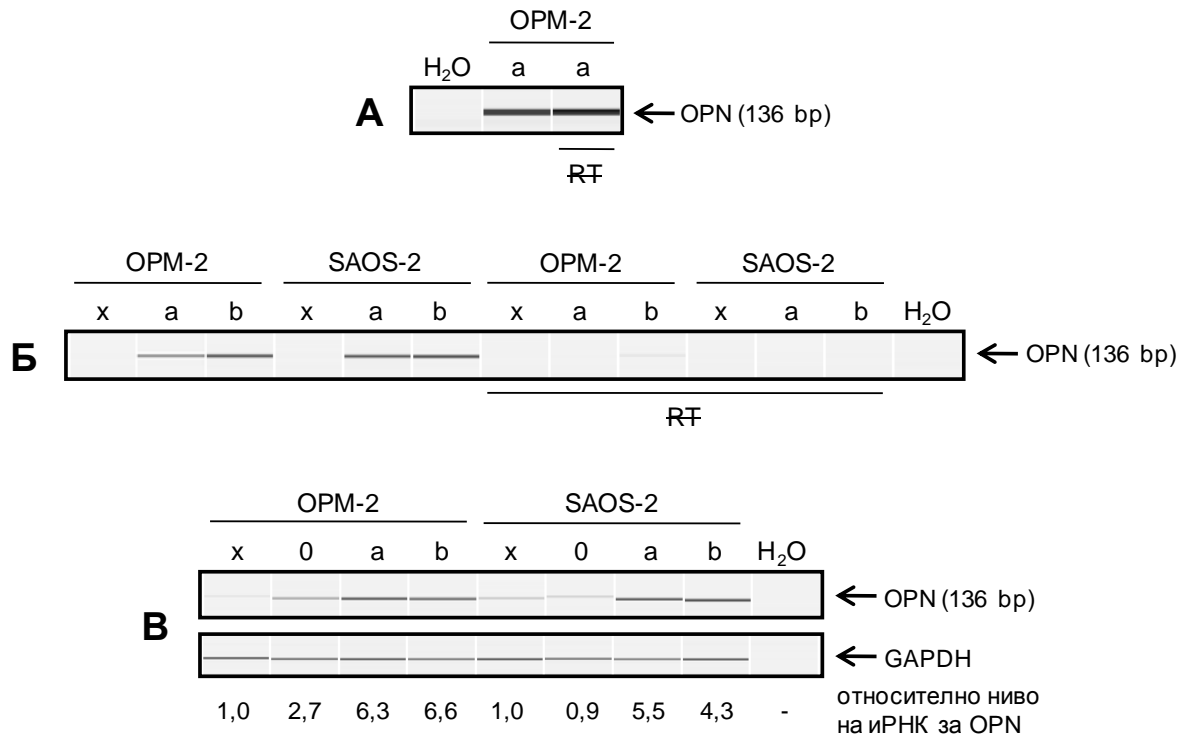
Клетки OPM-2 и SAOS-2 бяха трансфектирани с плазмиди рOPN-a или рOPN-b, носещи съответно ген за OPN-a или за OPN-b, или с празен плазмиден вектор рсDNA™3.1(+). С цел да се провери успешността на трансфекцията и функционирането на въведените гени, 48 часа по-късно бяха взети проби от клетките. Една проба от клетки OPM-2, трансфектирани с рOPN-a, беше анализирана чрез RT-PCR за наличие на иРНК за синтез на остеопонтин. Тъй като използваният метод за изолиране на РНК от клетките не позволява пълно пречистване от ДНК-молекули с дължина по-малка от 10 000 bp, съществува риск самите плазмиди да послужат за матрица при PCR и да се получи фалшиво положителен резултат. Ето защо втора, контролна РНК-проба от съ-



Фиг. IV.83. Епифлуоресцентна микроскопия на клетки OPN-2, оцветени с DAPI. А – нетрансфектирани клетки (система от филтри за наблюдение на DAPI); Б – нетрансфектирани клетки (система от филтри за наблюдение на FITC); В – клетки, трансфектирани с флуоресциращ олигонуклеотид Block-iT™ (система от филтри за наблюдение на DAPI); Г – клетки, трансфектирани с флуоресциращ олигонуклеотид Block-iT™ (система от филтри за наблюдение на FITC). Снимки А и Б, както и снимки В и Г, показват едно и също зрително поле.

щите клетки беше подложена на PCR без предшестваща обратна транскрипция. Получените резултати са представени на фиг. IV.84.А. Наблюдава се силен сигнал и в двете проби, което показва, че в този си вид методът е неподходящ за изследване на промени в нивото на иРНК за синтез на OPN при трансфектирани клетки.

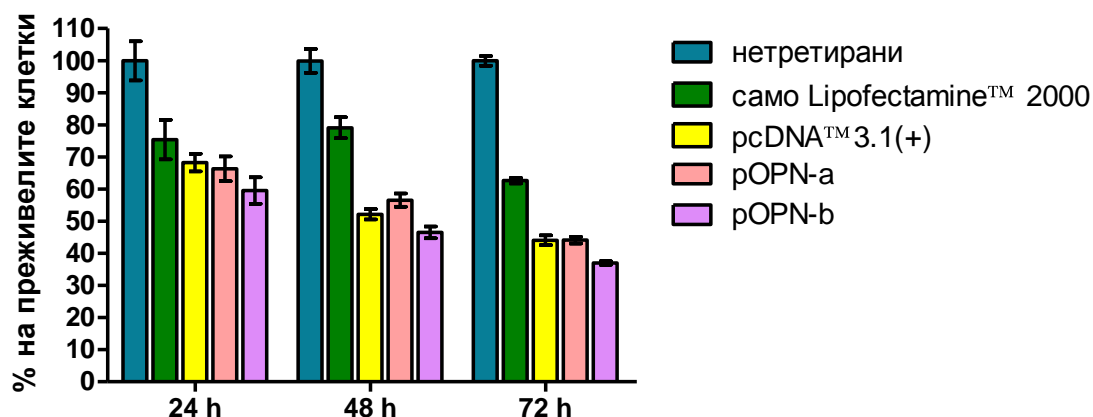
На следващ етап, изолираната РНК от клетките беше обработена с ДНК-аза, за да се разградят пречещите плазмиди. Всяка обработена проба беше разделена на две части, като едната беше подложена на RT-PCR, а другата – само на PCR. Получените резултати са представени на фиг. IV.84.Б. Свидетелства за наличие на иРНК за синтез на OPN се виждат във всички проби от трансфектирани с рOPN-a или рOPN-b клетки, но само в случаите, когато изолираната РНК е била подложена на обратна транскрипция преди провеждане на полимеразната верижна реакция. В пробите от нетрансфектирани клетки не се открива иРНК за синтез на OPN.



Фиг. IV.84. Демонстрация чрез RT-PCR, че приложените плаزمиди, носещи гени за остеопонтин (OPN), са успешно трансфектирани в клетки OPM-2 и SAOS-2 и се транскрибират до иРНК (48 часа след трансфекцията). А – РНК-пробите не са обработени с ДНК-аза. Б и В – РНК-пробите са обработени с ДНК-аза. Легенда: x - нетрансфектирани клетки; 0 – клетки, трансфектирани с празен плазмиден вектор pсDNA™3.1(+); a – клетки, трансфектирани с плазмид рOPN-a; b – клетки, трансфектирани с плазмид рOPN-b; H₂O – водна контрола; RT – РНК-проби, които не са подложени на обратна транскрипция, а направо са използвани за субстрат на PCR. Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции на В е проконтролирано чрез паралелна PCR със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH). Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на иРНК за OPN в отделните проби.

При следващо потвърдително и сравнително изследване обработените с ДНК-аза РНК-проби бяха подложени отново на RT-PCR, като този път бяха изследвани и нивата на иРНК за синтез на GAPDH. Получените резултати са представени на фиг. IV.84.В. Вижда се, че трансфектираните с рOPN-a или рOPN-b клетки OPM-2 имат съответно 6,3 или 6,6 пъти по-високо ниво на иРНК за синтез на OPN от изходните нетрансфектирани OPM-2. Трансфектираните с рOPN-a или рOPN-b клетки SAOS-2 имат съответно 5,5 или 4,3 пъти по-високо ниво на иРНК за синтез на OPN от нетрансфектираните SAOS-2.

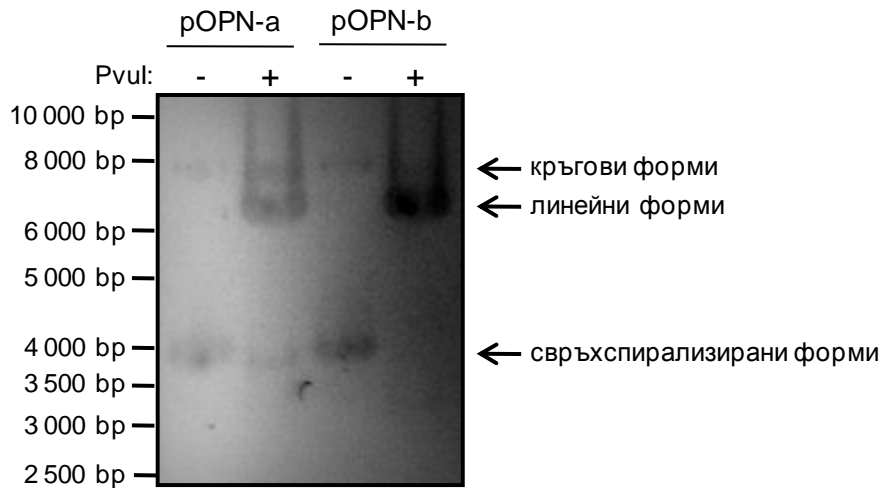
Преживяемостта на трансфектираните клетки OPM-2 беше оценена на 24-ия, 48-ия и 72-ия час след трансфекцията. Беше изследвана и преживяемостта на клетки, третирани само с Lipofectamine™ 2000. Получените резултати са представени на фиг. IV.85. Вижда се, че преживяемостта на трансфектираните клетки е значително по-ниска от тази на нетрансфектираните, но няма видима разлика между данните за клетките, трансфектирани с рOPN-a и тези, трансфектирани с празния вектор рсDNA™3.1(+). Преживяемостта на тези клетки е около 66-68% от контролната на 24-ия час, около 52-57% на 48-ия час и около 44% на 72-ия час. Малко по-голяма цитотоксичност се наблюдава при клетките, трансфектирани с рOPN-b (59,5%, 46,5% и 37,0% преживели клетки съответно на 24-ия, 48-ия и 72-ия час). Цитотоксичност се отчита и при клетките, третирани само с Lipofectamine™ 2000 (75,4%, 79,1% и 62,6% преживели клетки съответно на 24-ия, 48-ия и 72-ия час).



Фиг. IV.85. Преживяемост на клетки OPM-2 след трансфекция с плаزمиди, носещи ген за OPN-a или за OPN-b. Включени са нетретирани контроли, както и такива, трансфектирани с празен плазмиден вектор рсDNA™3.1(+) или третирани само с трансфектиращия агент Lipofectamine™ 2000. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 24-ия, 48-ия и 72-ия час от трансфекцията. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирани контрола, приета за 100%. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

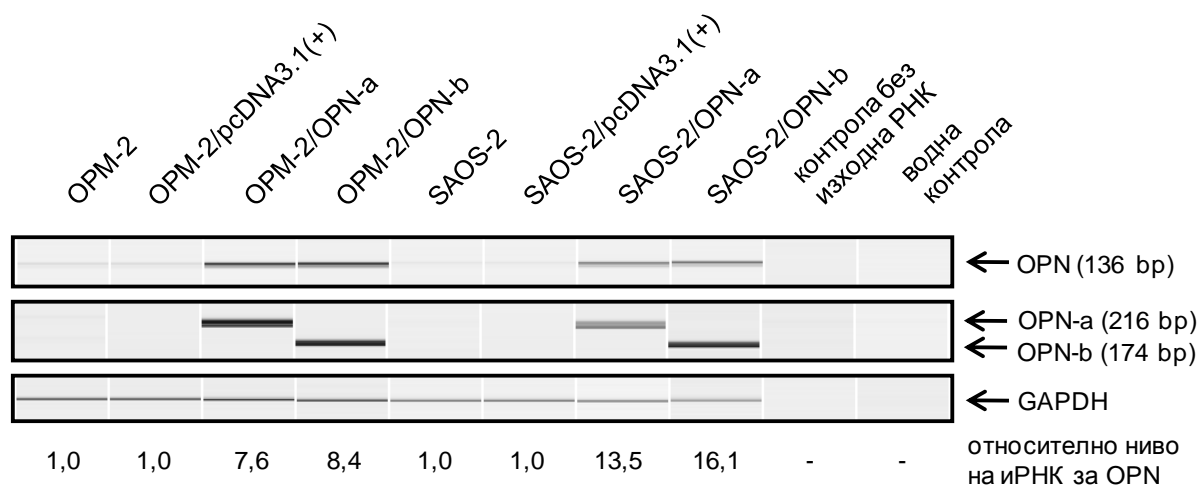
Тъй като голямата цитотоксичност на трансфектиращия реагент затруднява интерпретацията на резултатите (която би станала още по-трудна при допълнително третиране на клетките с цитотоксични вещества, за да се изследва дали ефектът им се повлиява от нивото на остеопонтин), беше предприето създаване на стабилно трансфектирани клетъчни клонове. Плазмидите бяха подложени на ензимна рестрикция, за да се линейризират и така да се улесни интеграцията им в клетъчния геном. Успешността на рест-

рикцията беше проверена чрез електрофореза на плазмидите в агарозен гел. Резултатите са представени на фиг. IV.86. Вижда се, че преди рестрикцията преобладават свръхспирализираните форми на плазмидите. По-малка част от плазмидните молекули са в кръгова форма, а линейни форми не се установяват. След провеждане на рестрикцията доминират линейните форми.



Фиг. IV.86. Линеаризиране на плаزمиди pOPN-a и pOPN-b под действие на рестриктазата RvuI. Рестрикцията е проведена за 4 часа при 37 °C и концентрация на ензима 4 U на 1 µg ДНК. По около 1 µg плазмидна ДНК (обработена с RvuI или не) са подложени на електрофореза в 0,8% агарозен гел, след което ДНК е визуализирана чрез оцветяване с етидиев бромид.

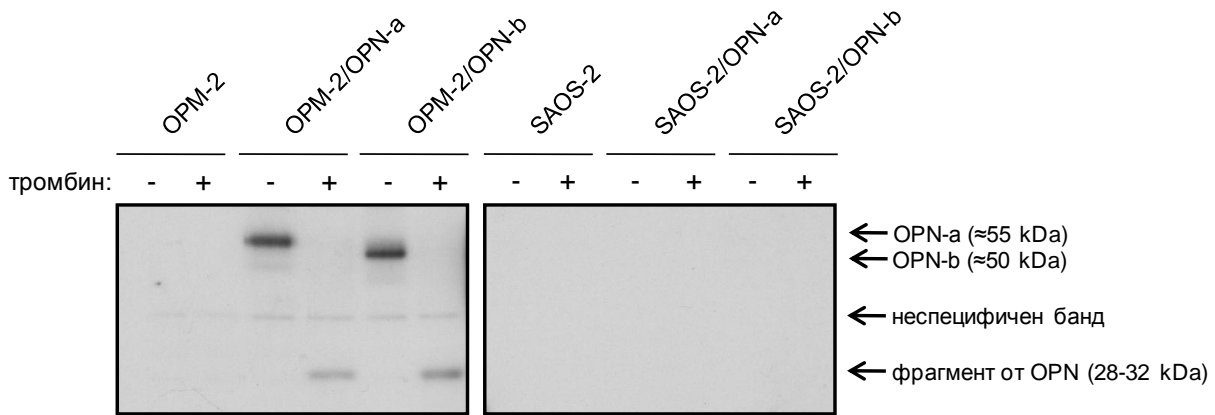
Клетки OPM-2 и SAOS-2 бяха трансфектирани с линеаризираните плазмиди, след което бяха култивирани в продължение на 2 месеца в селектираща среда, съдържаща антибиотика G418. След селекцията бяха сравнени нивата на иРНК за синтез на OPN в трансфектираните и в контролни нетрансфектирани клетки. Получените резултати са представени на фиг. IV.87. Вижда се, че стабилно трансфектираните производни OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b имат съответно 7,6 и 8,4 пъти по-високо ниво на иРНК за синтез на OPN от нетрансфектираните OPM-2, както и от стабилно трансфектираните OPM-2/pcDNA3.1(+). Повишението в първия случай е специфично за сметка на иРНК за синтез на OPN-a, а във втория – за сметка на иРНК за синтез на OPN-b. Стабилно трансфектираните производни SAOS-2/OPN-a и SAOS-2/OPN-b имат съответно 13,5 и 16,1 пъти по-високо ниво на иРНК за синтез на OPN от нетрансфектираните SAOS-2, както и от стабилно трансфектираните SAOS-2/pcDNA3.1(+). Повишението в първия случай е специфично за сметка на иРНК за синтез на OPN-a, а във втория – за сметка на иРНК за синтез на OPN-b.



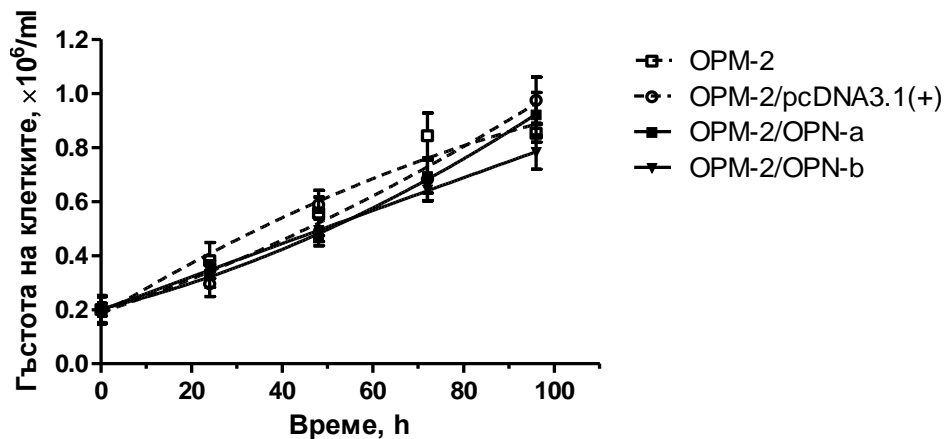
Фиг. IV.87. Сравнение чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на остеопонтин (OPN) в клетки OPM-2 и SAOS-2, както и в техни разновидности, получени след стабилна трансфекция с линеаризирани плаزمиди. Използвани са празният плазмиден вектор pcDNATM3.1(+), както и плазмидите pOPN-a и pOPN-b, носещи съответно ген за OPN-a или OPN-b. Клетките са култивирани в продължение на 2 месеца в селектираща среда, съдържаща антибиотика G418. Използвани са два различни чифта праймери за амплификация на участъци от кДНК за синтез на OPN. Първият чифт води до получаване на един и същ продукт (136 bp), независимо от това кой от трите известни транскрипта на гена за остеопонтин е послужил за субстрат. Вторият чифт води до получаване на различни по дължина продукти за отделните изоформи. Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции е проконтролирано чрез паралелна PCR със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-деhidрогеназа (GAPDH). Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на иРНК за остеопонтин в отделните проби.

Беше проведен имуноблот с проби от концентрирана кондиционирана среда, за да се установи дали стабилно трансфектираните клетки секретират OPN. Аликвотни части от пробите бяха обработени с тромбин, за да се установят с висока степен на достоверност бандовете на остеопонтин по настъпващата специфична фрагментация. Получените резултати са представени на фиг. IV.88. Остеопонтин се наблюдава в средата на стабилно трансфектираните производни OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b, но не и в средата на нетрансфектираните клетки OPM-2. В първия случай се секретира изоформата OPN-a, а във втория – OPN-b. В средата на стабилно трансфектираните производни SAOS-2/OPN-a и SAOS-2/OPN-b не се установява наличие на OPN.

На фиг. IV.89. са представени получените растежни криви за клетки OPM-2 и за техните стабилно трансфектирани производни. Не се наблюдават статистически значими различия в пролиферационната активност на отделните групи клетки.



Фиг. IV.88. Проверка дали стабилно трансфектираните с рOPN-a или рOPN-b клетки OPM-2 и SAOS-2 секретират съответната изоформа на остеопонтин (съотв. OPN-a или OPN-b) в хранителната си среда. Трансфектираните клетки са култивирани в продължение на 2 месеца в селектираща среда, съдържаща антибиотика G418. След това клетките са отглеждани в продължение на 3 дни в безсерумна среда Opti-MEM® I и от нея е извлечен протеинов концентрат. Той 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 остеопонтин.

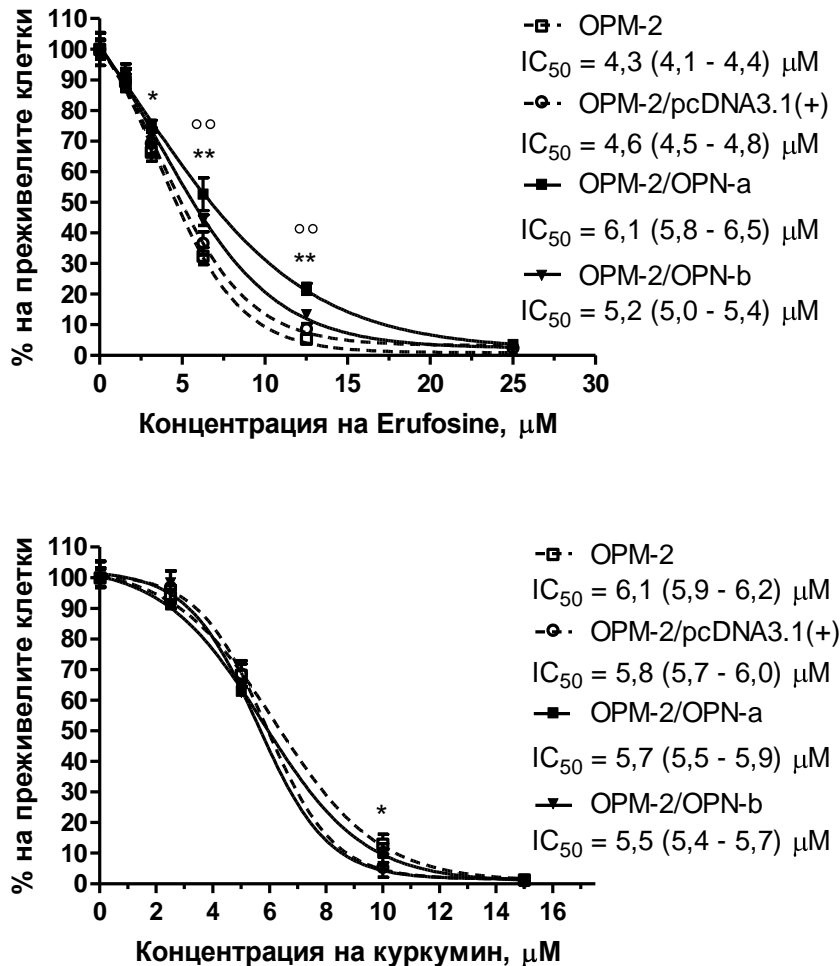


Фиг. IV.89. Растежни криви на клетки OPM-2 и на техните стабилно трансфектирани производни OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b. Клетките са „засадени“ при начална гъстота $2 \cdot 10^5$ /ml и са броени на всеки 24 часа до 96-ия час. Кривите са получени след нелинеен регресионен анализ на изходните данни. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

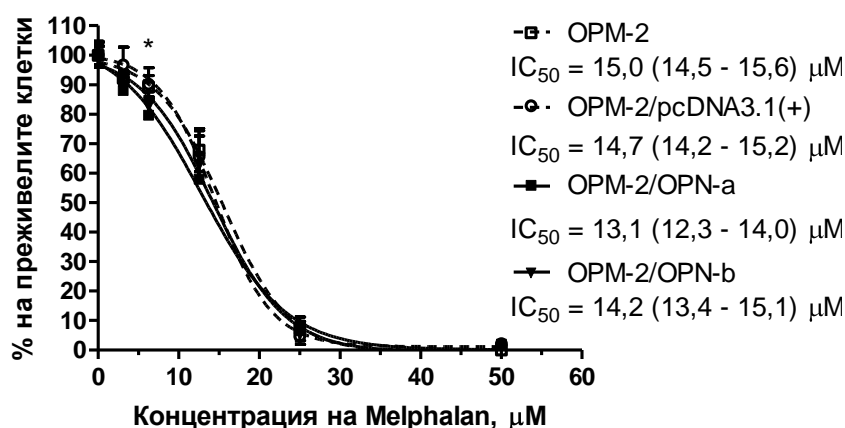
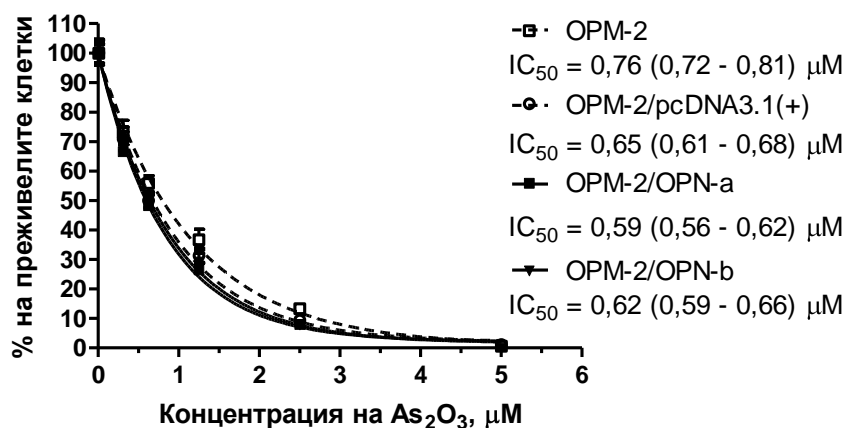
Беше проведено сравнително изследване на химиочувствителността на клетки OPM-2 и на техните стабилно трансфектирани производни. Получените резултати след третиране с **Erufosine** или **куркумин** за 48 часа са представени на фиг. IV.90. Вижда се, че от четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, най-високо лежи тази за клетките OPM-2/OPN-a, т.е. те са най-малко чувствителни. По-ниско е разположена кривата за OPM-2/OPN-b, а под нея, припокриващи се, са разположени кривите за OPM-2 и OPM-2/pcDNA3.1(+). Статистически значими разлики между преживяемостта на клетки OPM-2/pcDNA3.1(+) и тази на OPM-2/OPN-a се наблюдават при 6,25 и 12,5 μM Erufosine ($P < 0,01$), а също и при 3,13 μM Erufosine ($P < 0,05$). Статистически значими разлики между преживяемостта на клетки OPM-2/pcDNA3.1(+) и тази на OPM-2/OPN-b се наблюдават при 6,25 и 12,5 μM Erufosine ($P < 0,01$). Отчетените IC_{50} -стойности на Erufosine за OPM-2, OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b са съответно 4,3 (4,1 - 4,4) μM , 4,6 (4,5 - 4,8) μM , 6,1 (5,8 - 6,5) μM и 5,2 (5,0 - 5,4) μM . Четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, до голяма степен се припокриват. Отчетените IC_{50} -стойности за OPM-2, OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b също са много близки и са съответно 6,1 (5,9 - 6,2) μM , 5,8 (5,7 - 6,0) μM , 5,7 (5,5 - 5,9) μM и 5,5 (5,4 - 5,7) μM .

На фиг. IV.91. са представени получените резултати след третиране на клетките с **As₂O₃** или **мелфалан** за 48 часа. Вижда се, че четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация As₂O₃, до голяма степен се припокриват. Няма статистически значими разлики между преживяемостта на клетки OPM-2/pcDNA3.1(+), от една страна, и клетки OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b – от друга. Установените IC_{50} -стойности на As₂O₃ за OPM-2, OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b са съответно 0,76 (0,72 - 0,81) μM , 0,65 (0,61 - 0,68) μM , 0,59 (0,56 - 0,62) μM и 0,62 (0,59 - 0,66) μM . Четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация Melphalan, до голяма степен се припокриват. Статистически значима разлика между преживяемостта на OPM-2/pcDNA3.1(+) и тази на OPM-2/OPN-a или OPM-2/OPN-b се установява само след третиране с 6,25 μM Melphalan ($P < 0,05$), при която концентрация се наблюдава малко по-висока химиочувствителност на OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b. Отчетените IC_{50} -стойности на Melphalan за OPM-2, OPM-

2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b са съответно 15,0 (14,5 - 15,6) μM , 14,7 (14,2 - 15,2) μM , 13,1 (12,3 - 14,0) μM и 14,2 (13,4 - 15,1) μM .

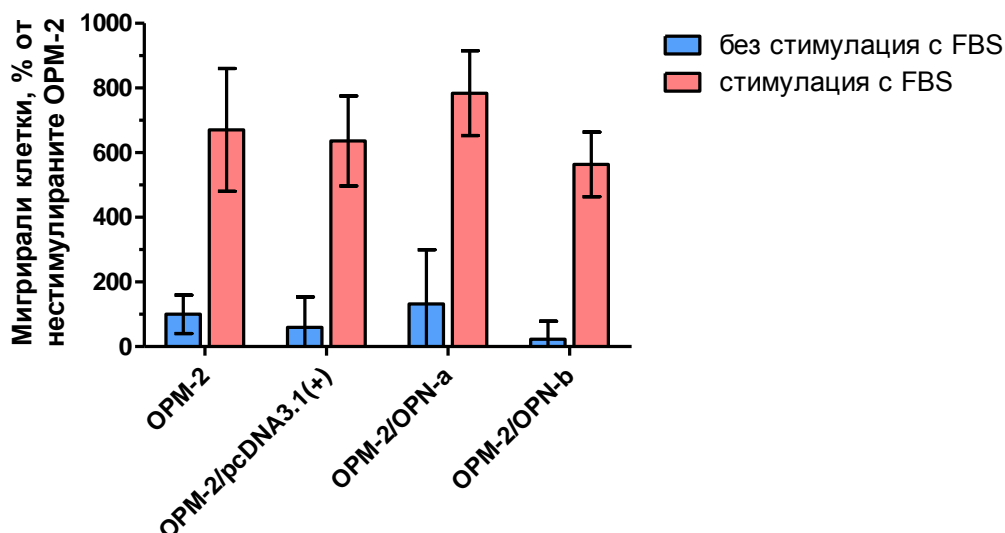


Фиг. IV.90. Влияние на засилената ендогенна продукция на остеопонтин върху чувствителността на клетки OPM-2 към цитотоксичното действие на Erufosine (горната графика) или куркумин (долната графика). Помежду си са сравнени „стандартни” клетки OPM-2 и техните стабилно трансфектирани производни OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine или куркумин. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана 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. Наличието на статистически значими разлики спрямо резултатите за клетки OPM-2/pcDNA3.1(+) е обозначено със звездички (за OPM-2/OPN-a) или кръгчета (за OPM-2/OPN-b). Една звездичка (кръгче) отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.



Фиг. IV.91. Влияние на засилената ендогенна продукция на остеопонтин върху чувствителността на клетки OPM-2 към цитотоксичното действие на As_2O_3 (горната графика) или Melphalan (долната графика). Помежду им са сравнени „стандартни“ клетки OPM-2 и техните стабилно трансфектирани производни OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с As_2O_3 или Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана 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. Звездичката обозначава статистически значима разлика ($P < 0,05$) между резултатите за клетки OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b и съответния резултат за клетки OPM-2/pcDNA3.1(+).

Беше проведено сравнително изследване на миграционната активност на клетки OPM-2 и на техните стабилно трансфектирани производни. Получените резултати са представени на фиг. IV.92. Не се наблюдават статистически значими разлики между отделните експериментални групи по отношение на броя мигрирали клетки.

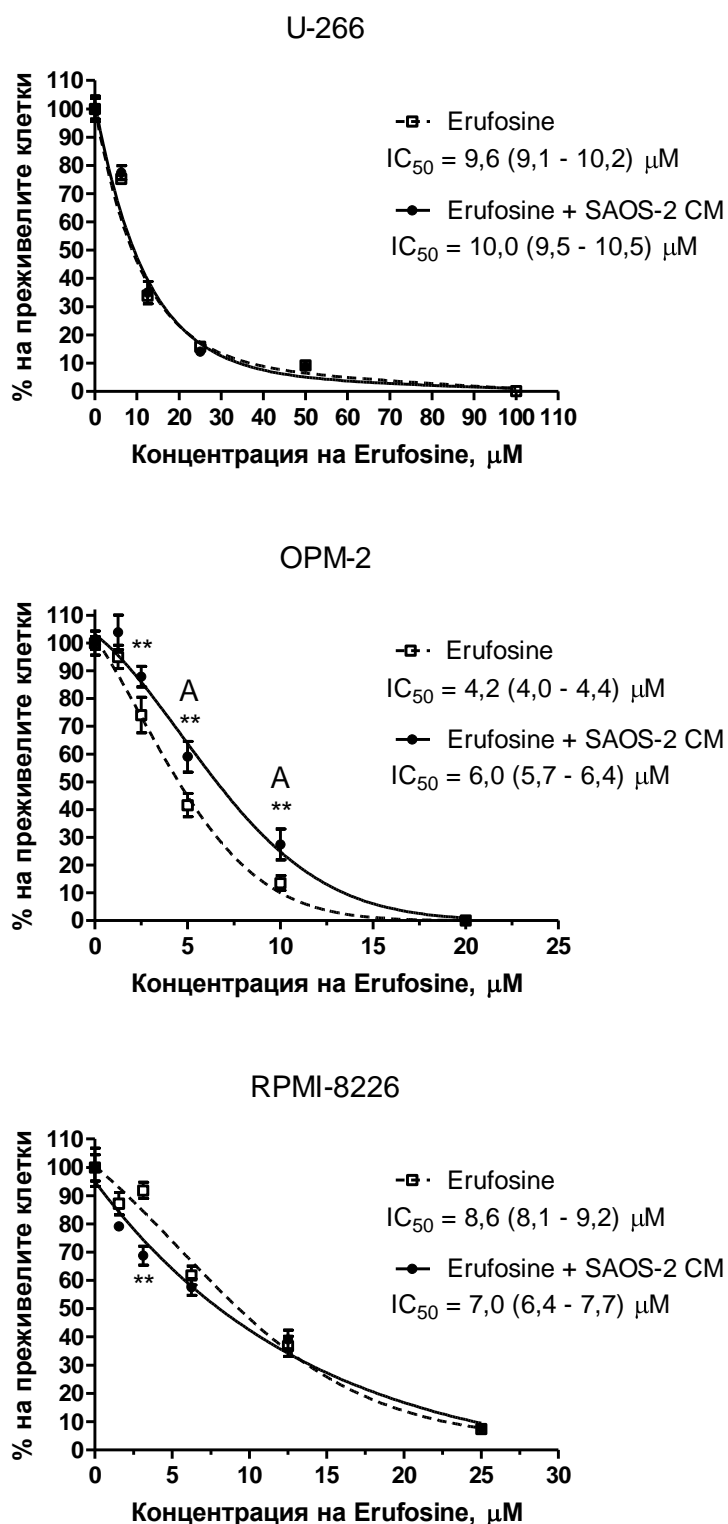


Фиг. IV.92. Влияние на засилената ендогенна продукция на остеооптин върху миграционната активност на клетки OPM-2. Помежду си са сравнени „стандартни“ клетки OPM-2 и техните стабилно трансфектирани производни OPM-2/pcDNA3.1(+), OPM-2/OPN-a и OPM-2/OPN-b. Преди провеждане на миграционния експеримент, клетките са отглеждани в безсерумна среда Opti-MEM® I в продължение на 24 часа. Като хемоатрактант е ползван фетален телешки серум (FBS), добавен в долния компартимент на миграционната постановка (10% крайна концентрация). Относителният брой на мигриралите за 12 часа клетки е определен флуорометрично, след оцветяването им с багрилото CellTiter-Blue®. Броят на мигриралите клетки OPM-2 в нестимулираната контролна група е приет за 100% и спрямо него са изчислени мигриралите клетки в останалите контролни и експериментални групи. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

Афинитетът на стабилно трансфектираните производни на OPM-2 да адхерират към монослой от остеобластни клетки SAOS-2 не се различава съществено от този на изходните клетки OPM-2 (описано подробно в т. 1.3.2.).

3.3. Влияние на кондиционирана среда от клетки SAOS-2

Беше изследвано влиянието на кондиционирана среда от клетки SAOS-2 върху химиочувствителността на миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Кондиционираната среда (означавана за краткост като SAOS-2 CM) и изследваните вещества бяха прилагани едновременно, при общо време на въздействие 72 часа. Получените резултати след съвместно приложение на **Erufosine** и **SAOS-2 CM** са представени на фиг. IV.93. Вижда се, че при третираните със SAOS-2 CM клетки OPM-2, кривата,

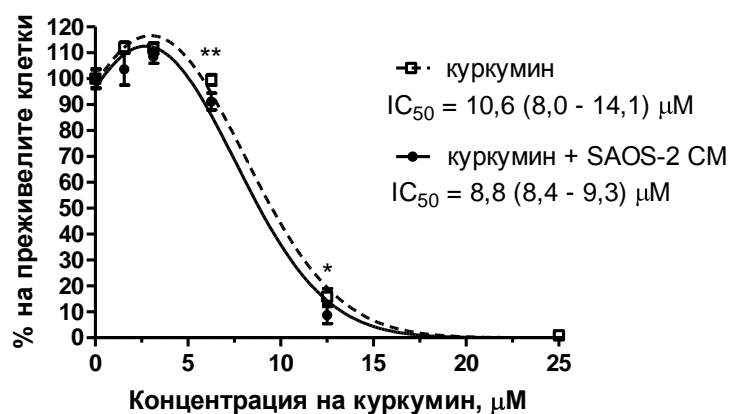


Фиг. IV.93. Влияние на кондиционирана среда от клетки SAOS-2 (означена за краткост като SAOS-2 CM) върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно със SAOS-2 CM. Обемът на използваната SAOS-2 CM е такъв, че да се получи разреждане 1:1 със средата, в която са отглеждани миеломните клетки. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с еруфозин 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 със SAOS-2 CM 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 А.

изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираниите със SAOS-2 CM клетки. Разликата е статистически значима при 2,5, 5 и 10 μM Erufosine ($P < 0,01$), като в последните два случая е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки OPM-2 след третиране с 5 μM еруфозин е 59,0% в присъствие на SAOS-2 CM и 41,6% в отсъствието ѝ, а след третиране с 10 μM еруфозин е 27,4% в присъствие на SAOS-2 CM и 13,5% в отсъствието ѝ. Отчетената IC_{50} на Erufosine за тази клетъчна линия е 6,0 (5,7 - 6,4) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 4,2 (4,0 - 4,4) μM в отсъствието ѝ. При клетки RPMI-8226 пък се наблюдава значително по-голям цитотоксичен ефект на 3,13 μM еруфозин, когато половината хранителна среда на клетките се състои от SAOS-2 CM ($P < 0,01$). IC_{50} на Erufosine за тази клетъчна линия е 7,0 (6,4 - 7,7) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 8,6 (8,1 - 9,2) μM в отсъствието ѝ. При третираните със SAOS-2 CM клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект от приложената концентрация еруфозин, се припокрива със съответната крива за нетретираниите със SAOS-2 CM клетки, т.е. в случая SAOS-2 CM не повлиява цитотоксичния ефект на еруфозина. IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия U-266 е 10,0 (9,5 - 10,5) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 9,6 (9,1 - 10,2) μM в отсъствието ѝ.

На фиг. IV.94. са представени получените резултати след едновременно приложение на **куркумин и SAOS-2 CM** върху клетки OPM-2. Вижда се, че при третираните със SAOS-2 CM клетки, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация куркумин, лежи малко по-ниско от съответната крива за нетретираниите със SAOS-2 CM клетки. Разликата е статистически значима при 6,25 и 12,5 μM куркумин ($P < 0,01$ в първия случай и $< 0,05$ във втория). IC_{50} на куркумина за тази клетъчна линия е 8,8 (8,4 - 9,3) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 10,6 (8,0 - 14,1) μM в отсъствието ѝ.

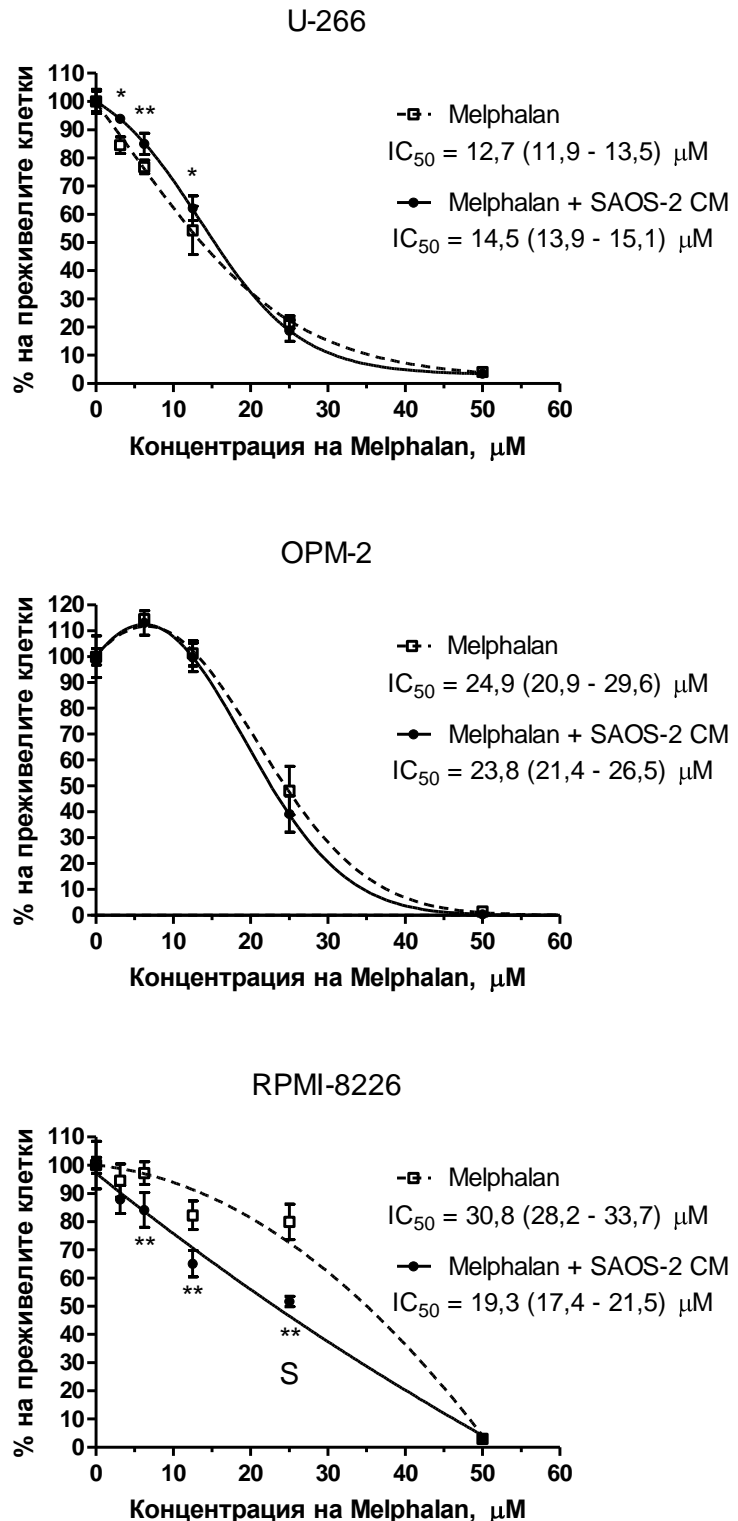
Получените резултати след едновременно приложение на **Melphalan и SAOS-2 CM** върху миеломни клетки са представени на фиг. IV.95. Вижда се, че при третираните със SAOS-2 CM клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация мелфалан, лежи по-ниско от съответната крива за нетретираниите със SAOS-2 CM клетки. Разликата е статистически значима при 6,25, 12,5 и 25 μM Melphalan ($P < 0,01$), като в последния случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки RPMI-8226 след третиране с 25 μM



Фиг. IV.94. Влияние на кондиционирана среда от клетки SAOS-2 (означена за краткост като SAOS-2 CM) върху цитотоксичната ефективност на куркумин спрямо миеломни клетки OPM-2. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с куркумин, приложен самостоятелно или едновременно със SAOS-2 CM. Обемът на използваната SAOS-2 CM е такъв, че да се получи разреждане 1:1 със средата, в която са отглеждани миеломните клетки. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с куркумин 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 със SAOS-2 CM проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.

мелфалан е 51,6% в присъствие на SAOS-2 CM и 79,9% в отсъствието ѝ. Отчетената IC_{50} на Melphalan за тази клетъчна линия е 19,3 (17,4 - 21,5) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 30,8 (28,2 - 33,7) μM в отсъствието ѝ. При клетки U-266 приложението на SAOS-2 CM води до понижаване на цитотоксичния ефект на мелфалана ($P < 0,05$ при 3,13 и 12,5 μM Melphalan; $P < 0,01$ при 6,25 μM Melphalan). IC_{50} на Melphalan за тази клетъчна линия е 14,5 (13,9 - 15,1) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 12,7 (11,9 - 13,5) μM в отсъствието ѝ. При третираните със SAOS-2 CM клетки OPM-2, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация мелфалан, до голяма степен се припокрива със съответната крива за нетретираните със SAOS-2 CM клетки, т.е. в случая SAOS-2 CM не повлиява цитотоксичния ефект на мелфалана. IC_{50} на Melphalan за тази клетъчна линия е 23,8 (21,4 - 26,5) μM в присъствие на SAOS-2 CM и 24,9 (20,9 - 29,6) μM в отсъствието ѝ.

Фиг. IV.95. Влияние на кондиционирана среда от клетки SAOS-2 (означена за краткост като SAOS-2 CM) върху цитотоксичната ефективност на Melphalan спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживяемостта на клетките е определена по MTT-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Melphalan, приложен самостоятелно или едновременно със SAOS-2 CM. Обемът на използваната SAOS-2 CM е такъв, че да се получи разреждане 1:1 със средата, в която са отглеждани миеломните клетки. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с мелфалан 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 със SAOS-2 CM проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$. Наличието на синергизъм (преживяемост на клетките, третирани с комбинацията $\leq 0,7 \times$ преживяемост на клетките, третирани само със същата концентрация Melphalan) е означено с буквата S.



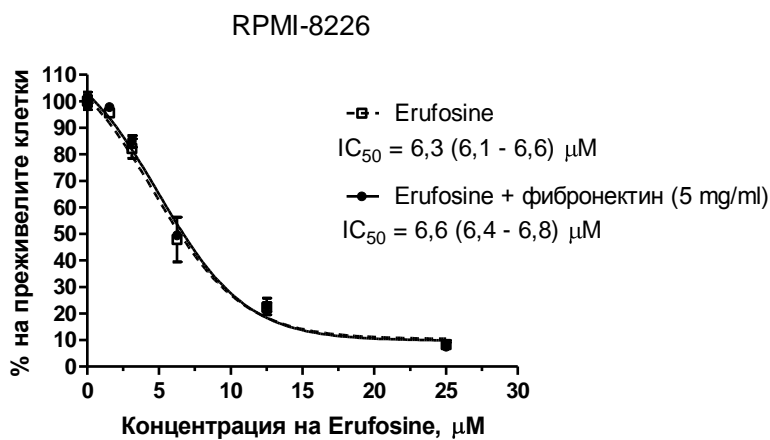
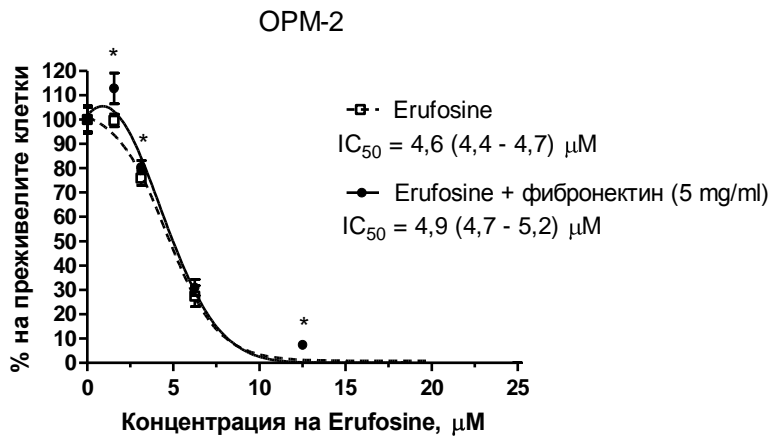
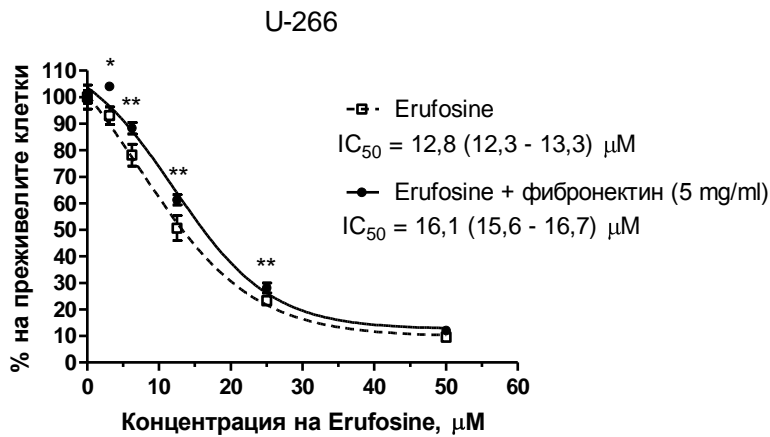
3.4. Влияние на фибронектин

Беше изследвано влиянието на фибронектина върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Фибронектинът беше прилаган в крайна концентрация 5 mg/ml, едновременно с еруфозина. Получените резултати (отчетени на 72-ия час) са представени на фиг. IV.96. Вижда се, че при третираните с фибронектин клетки U-266, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с фибронектин клетки. Разликата е статистически значима при 6,25, 12,5 и 25 μM Erufosine ($P < 0,01$), а също и при 3,13 μM Erufosine ($P < 0,05$). Отчетената IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия U-266 е 16,1 (15,6 - 16,7) μM в присъствие на фибронектин и 12,8 (12,3 - 13,3) μM в отсъствието му. При клетки OPM-2 приложението на фибронектин води до слабо понижаване на цитотоксичния ефект на еруфозина ($P < 0,05$ при 1,56, 3,13 и 12,5 μM Erufosine). IC_{50} на Erufosine за тази клетъчна линия е 4,9 (4,7 - 5,2) μM в присъствие на фибронектин и 4,6 (4,4 - 4,7) μM в отсъствието му. При третираните с фибронектин клетки RPMI-8226, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, се припокрива със съответната крива за нетретираните с фибронектин клетки, т.е. в случая фибронектинът не повлиява цитотоксичния ефект на еруфозина. IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия RPMI-8226 е 6,6 (6,4 - 6,8) μM в присъствие на фибронектин и 6,3 (6,1 - 6,6) μM в отсъствието му.

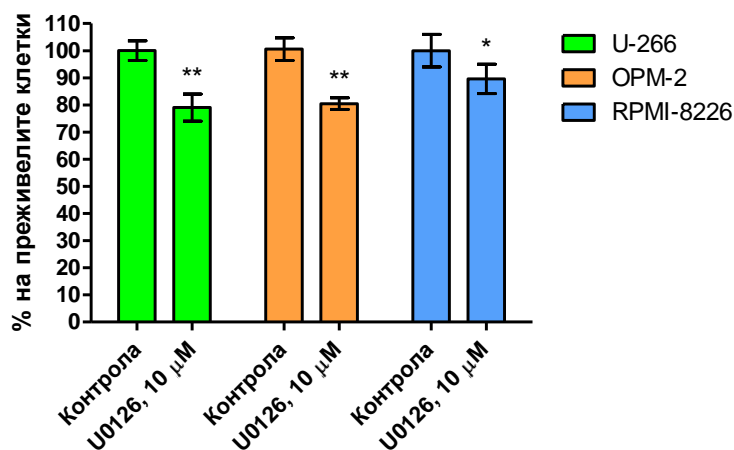
3.5. Влияние на MEK1/2

Първоначално бяха изследвани последствията от инхибиране на MEK1/2 върху пролиферационната активност на миеломни клетки от трите линии. Клетките бяха третирани за 48 часа с инхибитора U0126 в концентрация 10 μM . Получените резултати са представени на фиг. IV.97. Наблюдава се цитотоксичен ефект и при трите клетъчни линии. Преживяемостта на клетките спрямо нетретираната контрола е 79,0%, 80,5% или 89,6%, съответно за клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226.

Бяха изследвани комбинационните цитотоксични ефекти след едновременно третиране на миеломни клетки с U0126 и Erufosine за 48 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.98. Вижда се, че при третираните с U0126 клетки U-266, кривата, из-



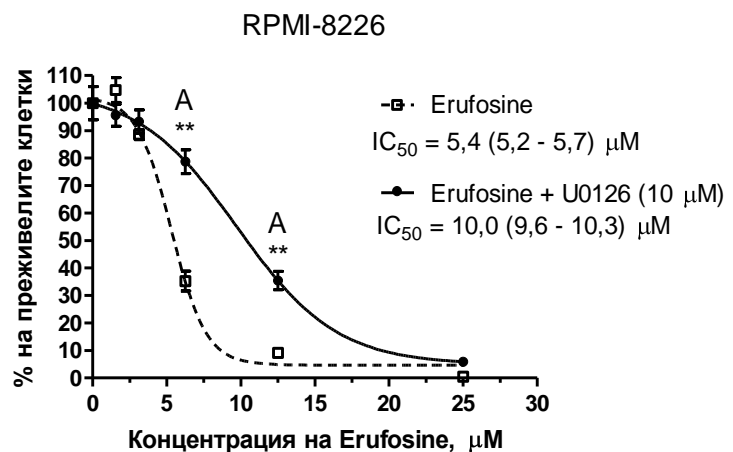
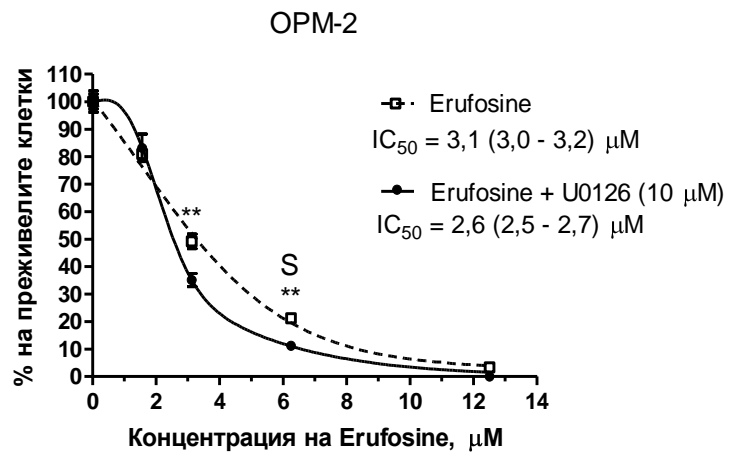
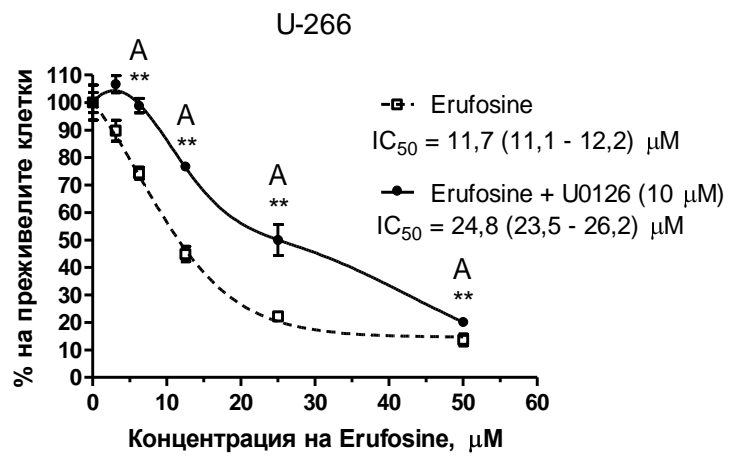
Фиг. IV.96. Влияние на фибронектин върху цитотоксичната ефективност на Erufosine спрямо миеломните клетъчни линии U-266 (горе), OPM-2 (по средата) и RPMI-8226 (долу). Преживемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 72-ия час след еднократно третиране с Erufosine, приложен самостоятелно или едновременно с 5 mg/ml фибронектин. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана с еруфозин 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 фибронектин проба. Една звездичка отговаря на $P < 0,05$, а две – на $P < 0,01$.



Фиг. IV.97. Цитотоксичност на U0126 (инхибитор на MEK1/2) спрямо миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с 10 µM U0126. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната нетретирана контрола, приета за 100%. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения. Звездичките обозначават статистически значими разлики спрямо съответната нетретирана контрола. Една звездичка отговаря на $P < 0,01$, а две – на $P < 0,001$.

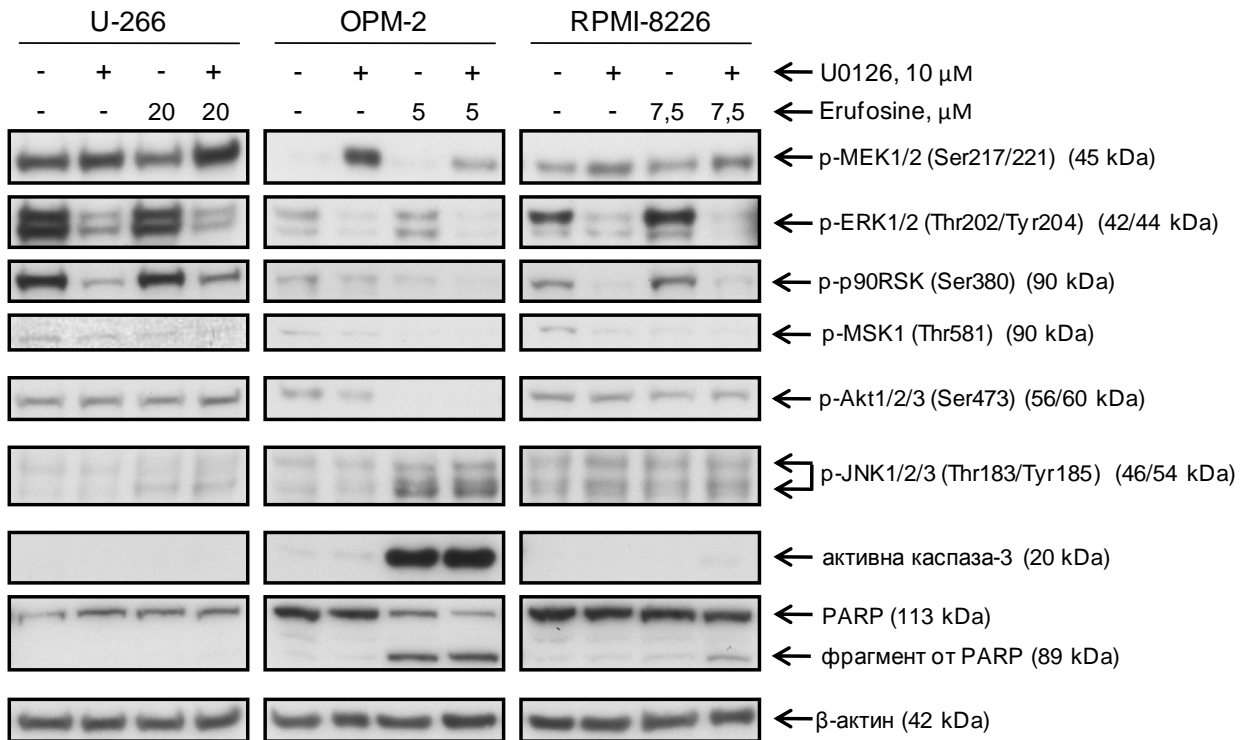
разяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-високо от съответната крива за нетретираните с U0126 клетки. При концентрации 6,25, 12,5, 25 и 50 µM Erufosine разликите са особено големи и отговарят на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки е: 98,9% след третиране с 6,25 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 74,3% след третиране само с 6,25 µM Erufosine; 76,8% след третиране с 12,5 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 44,9% след третиране само с 12,5 µM Erufosine; 50,0% след третиране с 25 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 22,2% след третиране само с 25 µM Erufosine; 20,2% след третиране с 50 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 13,7% след третиране само с 50 µM Erufosine ($P < 0,01$ във всички случаи). IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия U-266 е 24,8 (23,5 - 26,2) µM в присъствие на U0126 и 11,7 (11,1 - 12,2) µM в отсъствието му. При клетки RPMI-8226 също се наблюдава отслабване на цитотоксичния ефект на еруфозина в присъствие на U0126 ($P < 0,01$ при 6,25 и 12,5 µM Erufosine). Разликите в ефектите са големи и отговарят на заложените критерии за антагонистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки е: 78,7% след третиране с 6,25 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 35,3% след третиране само с 6,25 µM Erufosine; 35,5% след третиране с 12,5 µM Erufosine и 10 µM U0126 и 9,1% след третиране само с 12,5 µM Erufosine. IC_{50} на Erufosine за клетъчната линия RPMI-8226 е 10,0 (9,6 - 10,3)

Фиг. IV.98. 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 по МТТ-метода на Mosmann, 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 еруфозин 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 А. 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.



μM в присъствие на U0126 и 5,4 (5,2 - 5,7) μM в отсъствието му. При третираните с U0126 клетки OPM-2, кривата, изразяваща зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, лежи по-ниско от съответната крива за нетретираните с U0126 клетки. Разликата е статистически значима при 3,13 и 6,25 μM Erufosine ($P < 0,01$ и в двата случая), като във втория случай е достатъчно голяма, за да отговори на заложените критерии за синергистично взаимодействие. Процентът на преживелите клетки OPM-2 след третиране с 6,25 μM еруфозин е 11,3% в присъствие на U0126 и 21,2% в отсъствието му. IC_{50} на Erufosine за тази клетъчна линия е 2,6 (2,5 - 2,7) μM в присъствие на U0126 и 3,1 (3,0 - 3,2) μM в отсъствието му.

Беше изследвана функционалната активност на ключови сигнални протеини и на апоптотичните каскади в миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226, третирани самостоятелно с 10 μM U0126 за 1 час или последователно с 10 μM U0126 за 1 час и с цитотоксична концентрация еруфозин за още 16 часа. Получените резултати са представени на фиг. IV.99. (снимки на блотовете) и на таблица IV.8. (денситометрични данни). Данните показват, че самостоятелно приложен, U0126 предизвиква повишение в нивото на p-MEK1/2 (Ser217/221) и понижение в нивата на p-ERK (Thr202/Tyr204), p-p90RSK (Ser380) и p-MSK1 (Thr581) при всички клетъчни линии. Нивото на p-ERK спада около 2,5 пъти при клетки U-266 и около 3,3 пъти при клетки OPM-2 и RPMI-8226. Еруфозинът, приложен самостоятелно, предизвиква по-слабо изразени промени, свеждащи се до понижаване на нивото на p-p90RSK при клетки OPM-2 и на p-MSK1 при клетки OPM-2 и RPMI-8226, както и до повишаване на нивата на p-ERK и p-p90RSK при клетки RPMI-8226. Erufosine, приложен допълнително след U0126, подсилва покачването на нивото на p-MEK при клетки U-266 (наблюдаваното покачване е 2 пъти вместо 1,4 пъти) и потиска покачването на p-MEK при клетки OPM-2 (наблюдаваното покачване е 3,4 вместо 15,6 пъти). U0126 намалява наполовина нивото на p-Akt (Ser473) в клетки OPM-2, но не повлиява нивата му в другите две клетъчни линии. След третиране на клетки OPM-2 с еруфозин, нивото на p-Akt спада под прага на откриваемост, независимо дали преди това клетките са били изложени на действието на U0126 или не. Нивото на p-Akt в клетки U-266 не се повлиява нито от U0126, нито от Erufosine, а в клетки RPMI-8226 се наблюдава слабо понижаване на p-Akt след третиране с еруфозин, независимо дали преди това клетките са били третирани с U0126 или не. При никоя от трите миеломни клетъчни линии не се отчитат значителни промени в нивото на p-JNK (Thr183/Tyr185) след третиране с U0126. След третиране на клетките с Erufo-



Фиг. IV.99. Въздействие на U0126 и Erufosine, приложени самостоятелно или съвместно, върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини и върху апоптотичните каскади в миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Отделните видове клетки са третирани с различни (но еквивалентни) концентрации Erufosine или с 10 μM U0126, или пък и с двете вещества, като в този случай U0126 е приложен един час преди добавянето на еруфозин. Шестнадесет часа по-късно клетките са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби.

sine, нивото на p-JNK се покачва при OPM-2 (около 2,6 пъти) и при U-266 (около 2 пъти), независимо дали преди това клетките са били третрани с U0126 или не. U0126, приложен самостоятелно, не предизвиква активиране на каспаза-3 и фрагментиране на PARP при нито една от трите клетъчни линии. Еруфозинът, приложен самостоятелно, предизвиква активиране на каспаза-3 и фрагментиране на PARP само в клетки OPM-2. Делът на неактивния фрагмент на PARP в случая достига 55% от общото количество PARP. Когато OPM-2 са били третирани първо с U0126 и след това с еруфозин, делът на неактивния фрагмент на PARP достига 70% от общото количество PARP. При такава схема на третиране се наблюдава активиране на каспаза-3 и фрагментация на PARP (21% дял на неактивния фрагмент) дори и в клетки RPMI-8226.

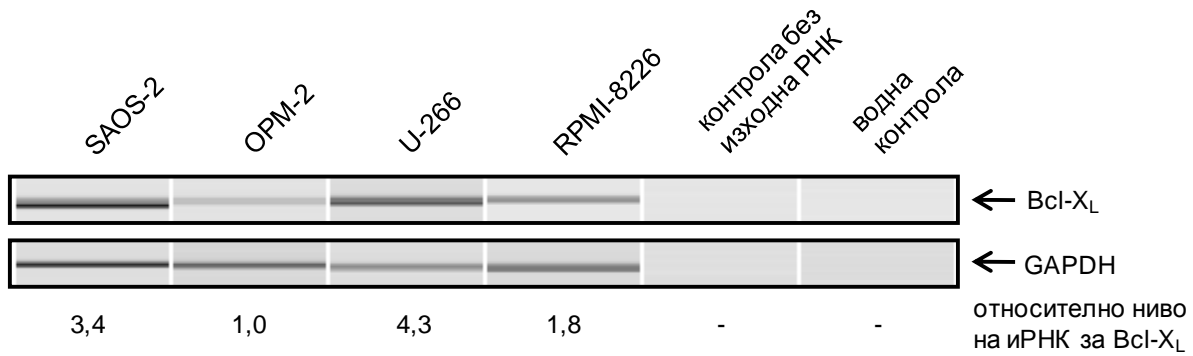
	U-266				OPM-2				RPMI-8226			
U0126, 10 μ M	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Erufosine, μ M	-	-	20	20	-	-	5	5	-	-	7,5	7,5
Относително ниво на p-MEK1/2	1,0	1,4	0,9	2,0	1,0	15,6	1,7	3,4	1,0	1,7	1,1	1,8
Относително ниво на p-ERK1/2	1,0	0,4	0,9	0,3	1,0	0,3	1,2	0,2	1,0	0,3	1,5	0,3
Относително ниво на p-p90RSK	1,0	0,2	1,0	0,4	1,0	0,6	0,3	0,1	1,0	0,1	1,5	0,2
Относително ниво на p-MSK1	1,0	0,7	0,8	0,5	1,0	0,4	0,1	0,05	1,0	0,4	0,3	0,1
Относително ниво на p-Akt1/2/3	1,0	1,1	1,1	1,3	1,0	0,5	0	0	1,0	0,9	0,6	0,6
Относително ниво на p-JNK1/2/3	1,0	0,9	1,9	2,3	1,0	1,0	2,7	2,6	1,0	1,4	1,1	1,4
Относително ниво на активна каспаза-3	0	0	0	0	1,0	2,9	59,2	52,4	0	0	0	+
Дял на неактивния фрагмент на PARP	0%	0%	0%	0%	6%	7%	55%	70%	7%	7%	10%	21%

Таблица IV.8. Въздействие на U0126 и Erufosine, приложени самостоятелно или съвместно, върху нивата на фосфорилираните (активните) форми на ключови сигнални протеини и върху апоптотичните каскади в миеломни клетки U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Отделните видове клетки са третирани с различни (но еквипотентни) концентрации Erufosine или с 10 μ M U0126, или пък и с двете вещества, като в този случай U0126 е приложен един час преди добавянето на еруфозин. Шестнадесет часа по-късно клетките са лизирани и са анализирани чрез имуноблот. Денситометрично определените интензитети на бандовете за фосфорилираните протеини и за активния фрагмент на каспаза-3 са разделени на съответните интензитети за контролния протеин β -актин. Получените съотношения при нетретирани контроли са приети за единица и спрямо тях са преизчислени останалите. Делът на неактивния фрагмент на PARP е изчислен като процент от общото количество PARP чрез съпоставка на интензитетите на съответните бандове.

Представените данни показват, че специфичното инхибиране на MEK1/2 с U0126 е свързано със значителни промени в противомиеломната ефективност на Erufosine.

3.6. Влияние на Bcl-X_L

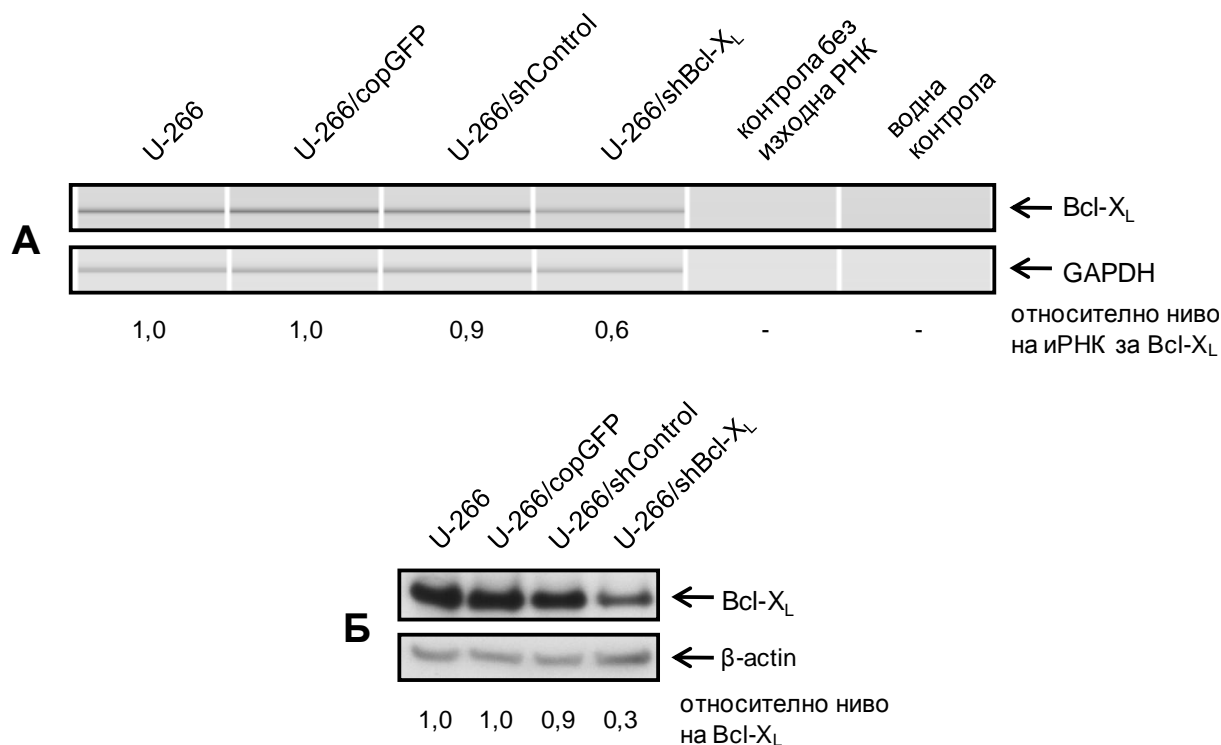
Преди да се изследва влиянието на Bcl-X_L върху противомиеломния ефект на изследваните вещества, беше направена съпоставка чрез RT-PCR на нивата на иРНК за синтез на Bcl-X_L в нетретирани клетки U-266, OPM-2, RPMI-8226 и SAOS-2. Получените резултати са представени на фиг. IV.100. Вижда се, че нивото на иРНК за синтез на Bcl-X_L е най-ниско в клетъчната линия OPM-2. Клетките SAOS-2 имат 3,4 пъти по-ви-



Фиг. IV.100. Сравнение чрез RT-PCR (28 цикъла) на нивата на иРНК за синтез на антиапоптотичния протеин Bcl-X_L в миеломните клетъчни линии OPM-2, U-266 и RPMI-8226 и в остеосаркомната SAOS-2. Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции е проконтролирано чрез паралелна PCR (23 цикъла) със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH). Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на иРНК за Bcl-X_L в отделните проби.

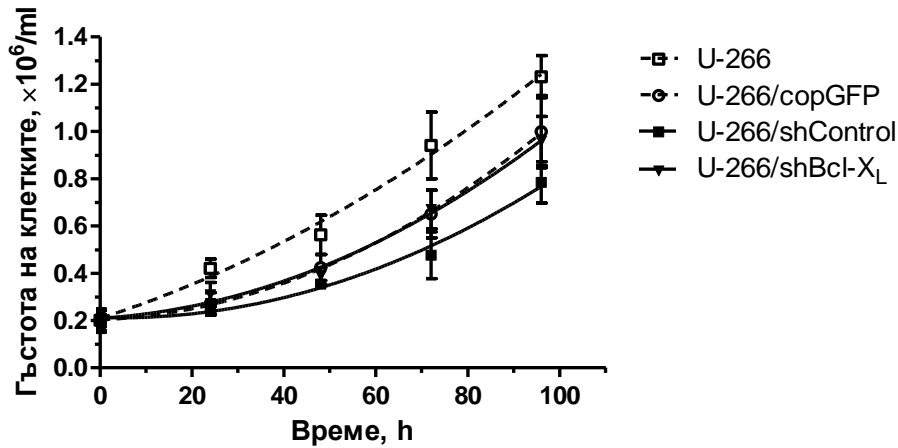
соко ниво, а RPMI-8226 и U-266 – съответно 1,8 и 4,3 пъти по-високо ниво на иРНК за синтез на Bcl-X_L. Бяха изследвани и нивата на протеина Bcl-X_L при отделните миеломни клетъчни линии. Резултатите са описани в т. 2.2. на настоящата глава.

Клетки U-266 бяха трансдуцирани с лентивируси, носещи ген за зелено-флуоресциращия протеин сорGFP, за контролна РНК-секвенция (shControl) или за интерферираща РНК, насочена срещу иРНК за човешки Bcl-X_L (shBcl-X_L). Успешността на трансдукцията беше потвърдена микроскопски, по зелената флуоресценция на клетките, получили ген за сорGFP. Беше извършена селекция на стабилно трансдуцирани клетки чрез култивиране на клетките в продължение на 2 месеца в среда, съдържаща антибиотика пурамицин. След селекцията бяха сравнени нивата на иРНК за синтез на Bcl-X_L в трансдуцираните и в контролни нетрансдуцирани клетки. Получените резултати са представени на фиг. IV.101.A. Вижда се, че нивото на иРНК за синтез на Bcl-X_L в стабилно трансдуцираните производни U-266/shBcl-X_L е 1,5 пъти по-ниско от това в стабилно трансдуцираните U-266/shControl и 1,7 пъти по-ниско от това в изходните клетки U-266. Функционирането на гена за интерфериращата РНК shBcl-X_L беше проверено и на протеиново ниво чрез имуноблот. Получените резултати са представени на фиг. IV.101.B. Вижда се, че количеството на Bcl-X_L в стабилно трансдуцираните клетки U-266/shBcl-X_L е 3 пъти по-малко от това в U-266/shControl и 3,3 пъти по-малко от това в изходните клетки U-266.



Фиг. IV.101. Сравнение на степента на експресия на Bcl-X_L (на РНК- и на протеиново ниво) в клетки U-266 и в техни разновидности, получени след стабилна трансдукция с лентивирусни частици. Използвани са вирусни частици, носещи ген за интерферираща РНК насочена срещу иРНК за Bcl-X_L (shBcl-X_L), както и контролни вирусни частици, носещи ген за зелено-флуоресцираща протеин copGFP или ген за контролна РНК-секвенция (shControl), която не предизвиква специфично разграждане на никоя известна иРНК. Трансдуцираните клетки са култивирани в продължение на 2 месеца в селектираща среда, съдържаща антибиотика пуромицин. След лизиране, от клетките са извлечени РНК и протеини и е проведена RT-PCR (А) или съответно имуноблот (Б). Еднаквото количество изходна кДНК в отделните реакции е проконтролирано чрез паралелна PCR със специфични праймери за доказване на кДНК за синтез на ензима глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа (GAPDH). Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на иРНК за Bcl-X_L в отделните проби. Контрол върху равномерността на нанасяне на пробите при имуноблота е проведен чрез сравняване на нивата на убиквитерния протеин β-актин в отделните проби. Евентуални отклонения са взети предвид при изчисляването на относителните нива на Bcl-X_L.

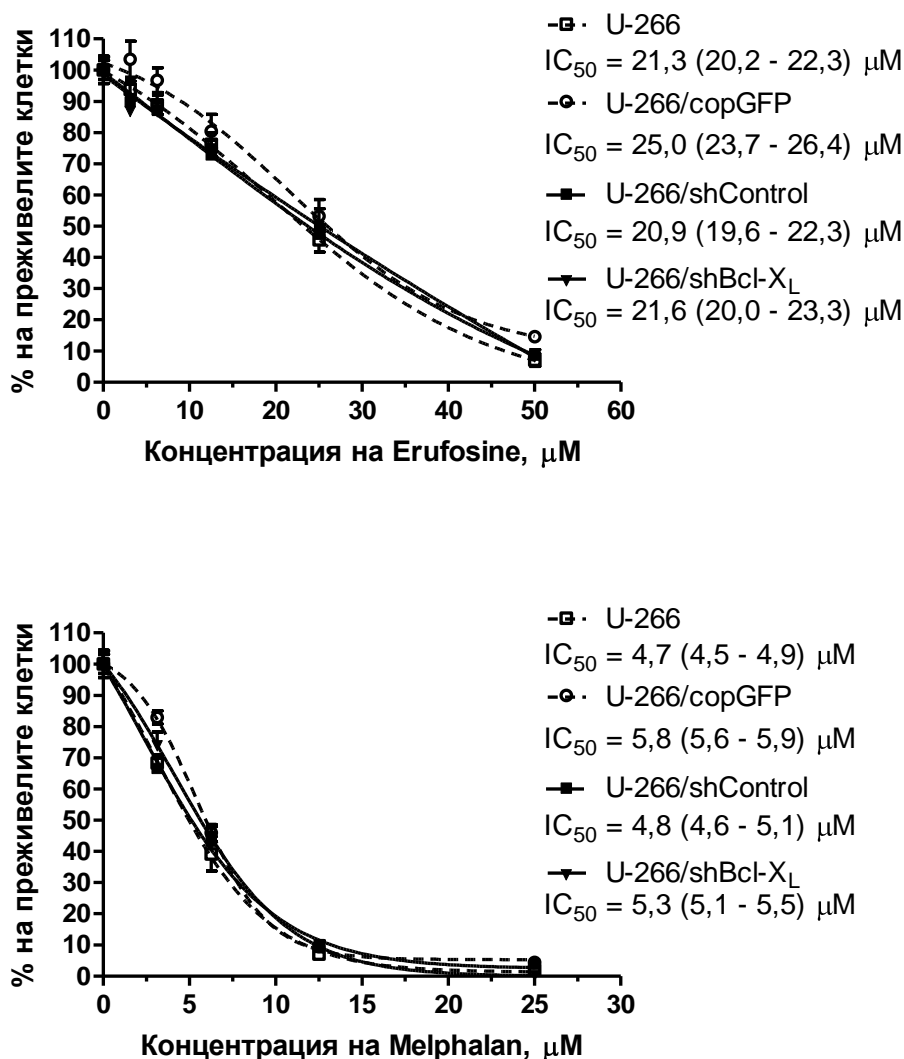
На фиг. IV.102. са представени получените растежни криви за клетки U-266 и за техните стабилно трансдуцирани производни. Всички стабилно трансдуцирани производни се характеризират с по-бавна пролиферация в сравнение с изходните нетрансдуцирани клетки. Най-бавно размножаващите се клетки са U-266/shControl.



Фиг. IV.102. Растежни криви на клетки U-266 и на техните стабилно трансдуцирани производни U-266/copGFP, U-266/shControl и U-266/shBcl-X_L. Клетките са „засадени“ при начална гъстота $2.10^5/\text{ml}$ и са броени на всеки 24 часа до 96-ия час. Кривите са получени след нелинеен регресионен анализ на изходните данни. За всички данни са показани съответните стандартни отклонения.

Беше проведено сравнително изследване на химиочувствителността на клетки U-266 и на техните стабилно трансдуцирани производни. Получените резултати след третиране с Erufosine или Melphalan за 48 часа са представени на фиг. IV.103. Вижда се, че четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация еруфозин, до голяма степен се припокриват. Няма статистически значими разлики в преживяемостта на отделните групи клетки. Установените IC₅₀-стойности на Erufosine за U-266, U-266/copGFP, U-266/shControl и U-266/shBcl-X_L са съответно 21,3 (20,2 – 22,3) μM, 25,0 (23,7 - 26,4) μM, 20,9 (19,6 - 22,3) μM и 21,6 (20,0 - 23,3) μM. Четирите криви, описващи зависимостта на цитотоксичния ефект (като процент преживели клетки) от приложената концентрация Melphalan, също до голяма степен се припокриват. Няма статистически значими разлики в преживяемостта на отделните групи клетки. Отчетените IC₅₀-стойности на Melphalan за U-266, U-266/copGFP, U-266/shControl и U-266/shBcl-X_L са съответно 4,7 (4,5 - 4,9) μM, 5,8 (5,6 - 5,9) μM, 4,8 (4,6 - 5,1) μM и 5,3 (5,1 - 5,5) μM.

Получените данни показват, че потискането само на Bcl-X_L не променя съществено химиочувствителността на клетки U-266 към Erufosine и Melphalan.



Фиг. IV.103. Липса на влияние на потиснатата експресия на Bcl-X_L върху чувствителността на клетки U-266 към цитотоксичното действие на Erufosine (горната графика) или Melphalan (долната графика). Помежду им са сравнени „стандартни“ клетки U-266 и техните стабилно трансдуцирани производни U-266/copGFP, U-266/shControl и U-266/shBcl-X_L. Преживяемостта на клетките е определена по МТТ-метода на Mosmann, на 48-ия час след еднократно третиране с Erufosine или Melphalan. Процентът на преживелите клетки е изчислен спрямо съответната не-третирана 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.

V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Сравнителен анализ на противомиеломната активност на изследваните вещества

Най-добре проученият представител на алкилфосфохолините (АФХ) при мултиплен миелом (ММ) е перифозинът. Той проявява силно изразена цитотоксична активност срещу миеломни клетъчни линии и първични култури от миеломни клетки, включително такива с развита резистентност към конвенционалните цитостатици (Hideshima, Catley et al. 2006; Gajate and Mollinedo 2007). $IC_{50(48h)}$ на Perifosine варира между 1,5 и 15 μM при различните клетъчни линии. В цитираните изследвания са включени и трите използвани от нас миеломни клетъчни линии – U-266, OPM-2 и RPMI-8226. Установено е, че перифозинът има значителна противотуморна ефективност *in vivo* при модел на ММ, базиран на човешки миеломни клетки MM.1S, инокулирани в голи мишки (Hideshima, Catley et al. 2006). Като недостатъци на перифозина могат да се изтъкнат холиномиметичната му активност, обуславяща ниска поносимост от страна на стомашно-чревния тракт, и хемолитичните му свойства, възпрепятстващи парентералното приложение (Konstantinov, Eibl et al. 1999).

Еруфозинът е представител на АФХ с ненаситена въглеводородна верига и модифицирана полярна глава и не страда от споменатите недостатъци на перифозина (Jendrossek, Hammersen et al. 2002). Еруфозинът никога досега не е бил проучван при ММ, което ни подтикна да проведем изследвания в тази насока. Получените от нас резултати показват, че Erufosine проявява значителна цитотоксичност към МП – клетъчни линии или първични култури, изолирани от пациенти с ММ. С по-висока чувствителност към еруфозин се отличават линиите OPM-2 и RPMI-8226. Отчетените за тях IC_{50} -стойности на еруфозина варират между 3 и 7,5 μM при отделните експерименти. Чувствителността на 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 (Gajate and Mollinedo 2007). Получените данни свидетелстват, че еруфозинът е почти толкова ефективен срещу миеломните

клетки, колкото и перифозинът, според публикуваните за него данни (Hideshima, Catley et al. 2006). До същия извод стигнахме и след пряко сравнение на цитотоксичността на Erufosine и Perifosine при клетки OPM-2. Данни от проучване на Erufosine при пациенти с ХЛЛ показват, че еруфозинът е много добре поносим и при плазмена концентрация до 60 μM не предизвиква значителни нежелани реакции (Fiegl, Lindner et al. 2008), т.е. постижима е значително по-висока плазмена концентрация от IC_{50} за най-резистентната от изследваните миеломни клетъчни линии.

Известно е, че куркуминът е цитотоксичен към човешки миеломни клетъчни линии като U-266, RPMI-8226, MM.1S и MM.1R, както и към първични култури от миеломни клетки (Bharti, Donato et al. 2003; Bharti, Shishodia et al. 2004; Alaikov, Konstantinov et al. 2007). От публикуваните данни се вижда, че $\text{IC}_{50(72\text{h})}$ на куркумина за клетки U-266 и RPMI-8226 е между 15 и 20 μM . В литературата обаче липсват данни за чувствителността на клетки OPM-2 към куркумин. 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. 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 ($\text{IC}_{50} \approx 6,2 \mu\text{M}$), по-малко срещу RPMI-8226 ($\text{IC}_{50} \approx 11,2 \mu\text{M}$) и най-малко срещу U-266 ($\text{IC}_{50} \approx 16,3 \mu\text{M}$). Още по-ниска ефективност се наблюдава спрямо мононуклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациенти с ММ, но това може да се обясни с факта, че тези клетки не са чиста популация само от МП, а както е известно, куркуминът е селективно цитотоксичен спрямо туморните клетки (Ravindran, Prasad et al. 2009). За съжаление, цитотоксичните концентрации на куркумина многократно надвишават постижимата плазмена концентрация след перорално приложение (1,77 μM след прием на 8 g куркумин) (Aggarwal, Kumar et al. 2003). Възлагат се надежди върху различни методи за повишаване на бионаличността на куркумина (Goel, Kunnumakara et al. 2008; Jurenka 2009).

Известно е, че диарсеновият триоксид е цитотоксичен при различни човешки миеломни клетъчни линии, включително U-266, RPMI-8226 и OPM-2, а също и при първични култури от миеломни клетки (Rousselot, Labaume et al. 1999; Hayashi, Hideshima et al. 2002; Karasavvas, Carcamo et al. 2005; Kajiguchi, Yamamoto et al. 2006; Wen, Feng et al. 2010). Има разминавания между публикуваните $\text{IC}_{50(48\text{h})}$ -стойности на As_2O_3 за клетки U-266 и RPMI-8226 – те варират от 0,75 до 2,5 μM и за двете клетъчни линии. Според нашите данни трите 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. Беше установена 4-5 пъти по-ниска цитотоксична ефективност на диарсеновия триоксид спрямо моноклеарни клетки, изолирани от костен мозък на пациент с ММ. За сравнение, C_{\max} след i.v. приложение на 10 mg As_2O_3 е в границите между 0,5 и 2 μM (Au and Kwong 2008).

Мелфаланът е алкилиращ цитостатик, използван в класическите схеми за лечение на ММ. Нашите данни показват, че клетъчната линия RPMI-8226 е най-резистентна към Melphalan (IC_{50} е над 30 μM , независимо от това дали мелфаланът се прилага за 48 или 72 часа). Моноклеарните клетки от костен мозък на пациенти с ММ са по-чувствителни, като за тях $IC_{50(72h)}$ -стойностите на мелфалана са между 12 и 33 μM . За сравнение, съответните IC_{50} -стойности за клетки U-266 и OPM-2 са в диапазона от 11 до 18 μM .

Бендамустинът е алкилатор, който има структурно подобие с пуриновите аналози. В литературата липсват достатъчно данни за неговата цитотоксичност при миеломни клетъчни линии. Според получените от нас резултати, клетъчните линии OPM-2 и RPMI-8226 имат еднаква чувствителност към Bendamustine. Интересно е, че при тези клетъчни линии се отчита по-ниска цитотоксичност на 72-ия, отколкото на 48-ия час след третиране с бендамустин ($IC_{50(48h)} \approx 122 \mu M$; $IC_{50(72h)} > 200 \mu M$), но това вероятно би могло да се обясни с нестабилността и разграждането на бендамустина във водна среда и последваща пролиферация на преживелите клетки. U-266 се отличава с по-голяма чувствителност към Bendamustine при 72-часово въздействие ($IC_{50(72h)} \approx 73 \mu M$). Цитотоксичната ефективност на Bendamustine срещу моноклеарни клетки от костен мозък на пациенти с ММ е сходна с тази срещу клетки OPM-2 и RPMI-8226. За сравнение, C_{\max} след i.v. приложение на 200 mg/m² Bendamustine е около 75 μM (Gandhi and Burger 2009). Независимо от сравнително ниската си противомиеломна активност, бендамустинът е ценен с това, че клетките с развита резистентност към други алкилатори не са кръстосано резистентни към него. Това вероятно се дължи на различния вид разкъсвания на ДНК, които бендамустинът предизвиква и които се репарират по-бавно, чрез изрязване на бази, а не под действие на алкилтрансферази (Leoni, Bailey et al. 2008; Dennie and Kolesar 2009).

През последното десетилетие протеазомният инхибитор Vortezomib намери широко приложение при лечение на ММ. Той е ефективен срещу МП в наномоларни концентрации (Hideshima, Chauhan et al. 2002; Koldehoff, Beelen et al. 2008; Ri, Iida et al. 2010). Според нашите наблюдения клетъчната линия RPMI-8226 е по-резистентна към борте-

зомиб ($IC_{50(72h)} \approx 3,5$ nM) в сравнение с линиите U-266 ($IC_{50(72h)} \approx 1,6$ nM) и OPM-2 ($IC_{50(72h)} \approx 1,7$ nM).

Обобщавайки направените дотук сравнения, може да се констатира, че клетъчната линия RPMI-8226 е най-малко чувствителна към широко използваните в клиничната практика Melphalan и Vortezomib. Бендамустинът също има ниска ефективност срещу тези клетки. В същото време, те са много чувствителни към алкилфосфохолина Erufo-sine. От друга страна, клетките U-266 са най-чувствителни към алкилиращи цитостатици и бортезомиб, 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 Bendamustine. 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.

Голям недостатък на основните лекарства за лечение на ММ е тяхната миелотоксичност. Диарсеновият триоксид също е миелотоксичен (Au and Kwong 2008). За разлика от тях, куркуминът е практически нетоксичен (Goel, Kunnumakkara et al. 2008; Hatcher, Planalp et al. 2008), а токсикологичният профил на алкилфосфохолините и в частност еруфозина не включва миелотоксичност. Те не са токсични за нормалните зрели лимфоцити (Gajate and Mollinedo 2007), а освен това могат да стимулират нормалната хемопоеза, както се вижда от редица публикувани изследвания (Stekar, Hilgard et al. 1995; Konstantinov, Topashka-Ancheva et al. 1998; Konstantinov, Georgieva et al. 2002; Catley, Hideshima et al. 2007; Fiegl, Lindner et al. 2008). Представените в настоящата дисертация резултати показват за пръв път, че еруфозинът стимулира нормални човешки стволови клетки да образуват гранулоцитно-макрофагеални (CFU-GM) колонии. Това отваря нова перспектива за употреба на Erufosine не само като антинеопластично лекарство, но и при трансплантацията на хемопоетични стволови клетки.

Според съвременните схващания за биологията на ММ, миеломните клетки са силно зависими от костно-мозъчната микросреда (Piazza, Gurrieri et al. 2007). 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. Известно е, че перифозинът потиска миграцията на миеломни клетки към хемокини и цитокини, присъстващи в костния мозък (Huston, Leleu et al. 2008). Нашите резултати за

първ път демонстрират антимиграционен ефект на Erufosine, като показват, че този АФХ специфично инхибира миграцията на миеломни клетки RPMI-8226 в концентрация, която няма пряк цитотоксичен ефект. Потискане на миграцията беше наблюдавано и при другите две миеломни клетъчни линии, но в случая беше отчетен и пряк цитотоксичен ефект, който сам по себе си може да е отговорен за по-малкия брой мигрирали клетки.

Известно е, че перифозинът потиска адхезията на миеломни клетки MM.1S към фибронектин (Huston, Leleu et al. 2008). Представените в настоящата дисертация данни свидетелстват, че еруфозинът също има антиадхезионен ефект и инхибира адхезията на миеломни клетки RPMI-8226 към фибронектин и остеопонтин. Подобен ефект е установен и за Vendamustine. Мелфаланът и диарсеновият триоксид потискат адхезията на клетки RPMI-8226 само към остеопонтин.

2. Рационални комбинации от вещества с противомиеломна активност

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 (Greco, Faessel et al. 1996).

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

1. 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 потенциране на цитотоксичните им ефекти при клетки U-266 и особено при RPMI-8226. 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. Тук е мястото да се отбележи, че перифозинът също участва в синергистично взаимодействие с мелфалан при миеломни клетки MM.1S

(Hideshima, Catley et al. 2006). Съвместното приложение на Erufosine и Bortezomib се характеризира с взаимно потенциране на цитотоксичните им ефекти и при трите изследвани миеломни клетъчни линии, но най-вече при RPMI-8226. Тези данни са аналогични на получените за Perifosine и Bortezomib при миеломни клетки MM.1S и OPM-1 (Hideshima, Catley et al. 2006; Hideshima, Catley et al. 2007). Смята се, че причината за наблюдавания синергизъм се корени от една страна в способността на алкилфосфохолина да неутрализира повишаването на степента на фосфорилиране на Akt, предизвиквано по принцип от бортезомиба, а от друга – в способността на Bortezomib да неутрализира повишаването на степента на фосфорилиране на ERK, предизвиквано по принцип от перифозина.

Комбинацията куркумин + бендамустин е подчертано синергистична при всички изследвани миеломни клетъчни линии. Тези резултати потвърждават и допълват по-рано получените данни за същата комбинация при клетки U-266 и RPMI-8226 (Alaikov, Konstantinov et al. 2007). Съвместното приложение на куркумин и мелфалан се характеризира с взаимно потенциране на цитотоксичните им ефекти при клетки U-266, докато комбинационният ефект при OPM-2 и RPMI-8226 е по-скоро адитивен. Резултатите от друго изследване обаче показват, че комбинацията куркумин + мелфалан е адитивно цитотоксична както срещу RPMI-8226, така и срещу U-266 (Bharti, Donato et al. 2003). От друга страна е установено, че куркуминът и мелфаланът взаимно потенцират цитотоксичните си ефекти при миеломни клетки MOLP-2 и резистентния им към мелфалан вариант MOLP-2/R (Xiao, Xiao et al. 2010). Авторите на това изследване обясняват наблюдавания ефект със способността на куркумина да потиска сигналния път FA/BRCA, отговорен за репарацията на ДНК. 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 някои концентрации. Синергистичен ефект срещу U-266 е установен и от други изследователи (Park, Аyyarpan et al. 2008), включително в U-266-базиран модел на ММ върху голи мишки (Sung, Kunnumakkara et al. 2009). Вероятна причина за това взаимодействие е фактът, че двете вещества инхибират активността на транскрипционния фактор NF-κB по различни механизми. Освен това куркуминът потиска фосфорилирането на STAT3, с което вероятно повишава чувствителността на клетките към цитостатици (Sung, Kunnumakkara et al. 2009).

2. Адитивни комбинации. Като такива могат да се определят комбинациите на As₂O₃ 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 Vendamustine 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 (1 μ M) се забелязва тенденция за проява на антагонизъм. Резултатите ни се подкрепят от наскоро публикувано изследване, което показва адитивни или синергистични цитотоксични ефекти на комбинацията As_2O_3 + Vortezomib срещу различни миеломни клетъчни линии (Wen, Feng et al. 2010).

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. Една от приложените дозови вариации е антагонистична при клетки OPM-2. В литературата са публикувани данни за взаимно потенциране на цитотоксичните ефекти на бортезомиба и мелфалана при някои други миеломни клетъчни линии (Ma, Yang et al. 2003; Mitsiades, Mitsiades et al. 2003). Комбинацията Vortezomib + Vendamustine в общия случай е адитивна и при трите миеломни клетъчни линии, но при определени концентрации настъпва взаимно потенциране на цитотоксичните ефекти.

3. 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. 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 (Jendrossek, Muller et al. 2003; Nieto-

Miguel, Gajate et al. 2008; Gills and Dennis 2009), а от друга страна е известно, че куркуминът може да инхибира JNK (Chen and Tan 1998; Gajate, An et al. 2003). 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. 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, да неутрализира As_2O_3 -индуцираното увреждане на ДНК (Mukherjee, Roy et al. 2007). Освен това куркуминът би могъл да инхибира JNK и така да възпрепятства индуцирането на апоптоза от страна на As_2O_3 (Hossain, Akhand et al. 2000).

Може да се обобщи, че като особено перспективно за противомиеломната терапия се очертава комбинирането на еруфозин или куркумин с алкилиращи цитостатици или бортезомиб. Може да се очаква, че подобни комбинации ще повишат честотата и продължителността на ремисиите и ще понижат честотата на НЛР. 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 (Rajkumar and Palumbo 2007).

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

Известно е, че остеобластните клетки SAOS-2 имат много ниско ниво на антиапоптотичния протеин Bcl-2, което е свързано с липсата в тези клетки на транскрипционния фактор WT1 (Mayo, Wang et al. 1999). От друга страна, за миеломните клетки е харак-

терна висока степен на експресия на този протеин (Mitsiades, Mitsiades et al. 2004). Нашите изследвания показват при пряко сравнение, че разликата между миеломните и остеобластните клетки по отношение на експресията на Vcl-2 е много голяма. При подходяща експозиция на филмите, SAOS-2 изглеждат напълно отрицателни за Vcl-2 на фона на Vcl-2-положителните миеломни клетки. Освен това се установи, че близкият контакт на миеломните клетки с остеобластите не стимулира последните да експресират по-голямо количество Vcl-2. Тези данни показват, че е налице възможност за отдиференциране на двата типа клетки в смесена популация чрез използване на специфични антитела срещу Vcl-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 Vcl-2 в клетките от фиксирания слой, използвайки стандартна процедура за имуноблот. Подробният оптимизиран протокол е представен в т. 2.6.2. на глава III. 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. Силно изразената склонност за адхезия на клетките RPMI-8226 би могла да се обясни с факта, че те свръхекспресират c-MAF (Drexler 2001), което от своя страна се свързва с повишена експресия на интегрин b7 и стимулиране на адхезията към СКМК (Tonon 2007). Бяха получени и данни, които показват, че повишаването на секрецията на остеоопонтин 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 (Navran 2008). Създаденият на тази база 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.

Подробният оптимизиран протокол за отглеждане на сфероидите е представен в т. 2.1.6. на глава III. Резултати, получени при използване на модела, показват как миеломни клетки U-266 инвазират сфероидите.

4. Механизъм на действие на изследваните вещества

Известно е, че алкилфосфохолинът перифозин индуцира апоптоза в миеломни клетки MM.1S (Hideshima, Catley et al. 2006; Huston, Leleu et al. 2008). В хода на проведените изследвания беше установено, че използваните от нас 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, а при RPMI-8226 – само кариопикноза. Промените при OPM-2 настъпват сравнително бързо (още на 16-ия час), което е характерно за апоптозата. Тези данни се подкрепят от резултатите, получени при точно-цитометричното изследване, показващи значително нарастване на суб-G1-фракцията при клетки OPM-2, но не и при U-266. 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). Това показва, 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 преките данни за активиране на апоптотичните каскади. В клетки OPM-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. Неапоптотични механизми вероятно участват и при реализирането на цитотоксичния ефект на Erufosine срещу клетки RPMI-8226. Въпреки че OPM-2 и RPMI-8226 имат сходна чувствителност към цитотоксичния ефект на еруфозина, минималната концентрация Erufosine, която предизвиква апоптоза при клетки RPMI-8226, е значително по-висока, отколкото при OPM-2. Подобни наблюдения са направени и по отношение на перифозина (Hideshima, Catley et al. 2007). В цитираното изследване авторите констатират, че цитотоксичният ефект на пе-

рифозина срещу МП не може да се обясни изцяло с индуцирането на стресова реакция и задействане на апоптотичните механизми. Освен това е известно, че АФХ предизвикват особен вид клетъчна смърт на глиомните клетки, която съчетава характерни белези за некрозата и за апоптозата и не се възпрепятства от присъствието на пан-каспазни инхибитори (Naumann, Wischhusen et al. 2004). Предложени са две алтернативни хипотези за механизма, по който АФХ индуцират апоптоза. Според първата АФХ могат да активират рецепторите Fas/CD95 без наличието на съответния лиганд (Gajate and Mollinedo 2001; Oberle, Massing et al. 2005; Gajate and Mollinedo 2007). Според втората хипотеза, апоптозата, предизвиквана от АФХ, протича независимо от „рецепторите на смъртта” и външния апоптотичен път (Jendrossek, Muller et al. 2003). Основните аргументи в подкрепа на последната хипотеза са способността на еруцилфосфохолина да предизвиква апоптоза в лимфоидни клетки Jurkat, резистентни към FasL/CD95L и TRAIL, както и незначителното активиране на каспаза-3 в клетки Jurkat, експресиращи доминантно-негативна каспаза-9 или свръхекспресиращи Bcl-2. По-нови данни обаче показват, че свръхекспресията на Bcl-2 не предпазва лимфобластни клетки SKW6.4 от апоптоза под действие на АФХ (Oberle, Massing et al. 2005) и че е необходимо наличие на Fas/CD95, за да може АФХ да индуцират апоптоза в миеломни клетки (Gajate and Mollinedo 2007). Тези привидно противоречащи си данни биха могли да се обяснят с разлики между различните клетъчни линии по отношение на сигналната трансдукция чрез Fas/CD95, напр. клетките SKW6.4 са от първи тип, а Jurkat – от втори тип според класификацията на Scaffidi и съавтори (Scaffidi, Fulda et al. 1998; Oberle, Massing et al. 2005). При клетките от първи тип количеството каспаза-8, което се обработва при активиране на Fas/CD95, е достатъчно за активиране на ефекторните каспази. Клетките от втори тип се характеризират с ниска степен на първоначално активиране на каспаза-8 и апоптозата при тях е силно зависима от механизъм с положителна обратна връзка, включващ посредничеството на проапоптотичния протеин Bid и митохондриите и усилващ активирането на каспаза-8. Получените от нас резултати за клетъчната линия RPMI-8226 показват, че при тези клетки най-напред се активира каспаза-8. Ниската степен на активиране на тази каспаза и високите нива на антиапоптотичните протеини Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1, възпрепятстващи функционирането на гореописания усилващ механизъм с положителна обратна връзка, са в полза на хипотезата, че миеломните клетки могат да се класифицират като II тип. Тази хипотеза се подкрепя допълнително от получените данни за клетъчната линия RPM-2. Тези клетки имат пренебрежимо ниска експресия на Bcl-X_L, т.е. усилващият механизъм не би трябвало да е инхибиран. Това предположение

се потвърждава от наблюдаваното в тези клетки силно активиране и на двете инициаторни каспази след третиране с Erufosine.

Множество изследвания показват, че Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 придават лекарствена резистентност при ММ (Song, Li et al. 2002; Kline, Rajkumar et al. 2007; Trudel, Li et al. 2007). Повишената експресия на Bcl-2 обуславя резистентност към интерферон, дексаметазон, етопозид, доксорубицин и бортезомиб (Tu, Xu et al. 1996; Feinman, Koury et al. 1999; Mitsiades, Mitsiades et al. 2002; Panaretakis, Pokrovskaja et al. 2002), а свръхекспресията на Bcl-X_L от страна на миеломните клетки им придава резистентност към доксорубицин и мелфалан (Tu, Renner et al. 1998). В допълнение, проучване на генната експресия при 60 туморни клетъчни линии разкрива, че Bcl-X_L играе уникална роля в общата резистентност към цитостатици (Amundson, Myers et al. 2000). Нашите резултати показват, че податливостта на трите миеломни клетъчни линии към апоптоза, инициирана от Erufosine, е обратно пропорционална на нивата на Bcl-X_L и Mcl-1. Високите нива на Bcl-X_L и Mcl-1 в U-266 биха могли да се обяснят с автокринната продукция на IL-6 (Jernberg-Wiklund, Pettersson et al. 1992; Puthier, Derenne et al. 1999). Известно е, че IL-6 активира сигналния път JAK/STAT в клетки U-266, а STAT3 от своя страна се свързва с промоторите на гените за Bcl-X_L и Mcl-1, с което повишава експресията на тези антиапоптотични протеини и придава резистентност на клетките към FasL/CD95L (Puthier, Bataille et al. 1999; Kawamura, Kizaki et al. 2000).

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. Поява на подобен протеинов фрагмент е описана и при други, немиеломни клетъчни линии под влияние на различни вещества и се дължи на „срязване“ на Bcl-2 при Asp34 от активна каспаза-3 (Cheng, Kirsch et al. 1997; Wan, Wang et al. 2006). Установено е, че този фрагмент допълнително активира ефекторните каспази. Получаването на такъв фрагмент от Bcl-2 може да обясни наблюдаваната от нас податливост на клетки OPM-2 към апоптоза. При тези клетки се наблюдава и значително понижаване на нивото на Mcl-1 след третиране с Erufosine. Известно е, че този протеин също може да бъде „срязан“ от каспази и да се получи фрагмент с проапоптотични свойства (Le Gouill, Podar et al. 2004). След третиране на клетки RPMI-8226 с еруфозин не бяха наблюдавани промени, засягащи антиапоптотичните протеини, което съответства на данните за трудно индуциране на апоптоза при тези клетки. Други изследователи не са установили промени в Bcl-2, Bcl-X_L и Mcl-1 при нито една от 4 миеломни клетъчни линии, вкл. OPM-2, след

третиране с Perifosine (Hideshima, Catley et al. 2007). Това разминаване вероятно се дължи на приложеното от тях твърде кратко време на въздействие с перифозин (6 часа).

При нашите изследвания беше установено, че под действие на Erufosine в клетки RPMI-8226 се повишава нивото на липидно-свързаната форма на протеина LC3B – признак за стимулиране на автофагичния процес. Стимулиране на автофагията е установено и при клетъчни линии от белодробен карцином след третиране с Perifosine (Fu, Kim et al. 2009). Автофагията е механизъм за разграждане на клетъчни компоненти с участието на лизозомите, който е от голямо значение за поддържане на клетъчната хомеостаза. В зависимост от обстоятелствата, автофагията може да допринесе за оцеляване на клетките или да води до клетъчна смърт. Миеломните клетки синтезират големи количества имуноглобулини, което закономерно води до високи нива на неправилно нагънати протеини и оттам до токсични прояви (Hoang, Benavides et al. 2009). Смята се, че стимулирането на автофагията подпомага разграждането на тези токсични протеини и е от важно значение за оцеляването на МП. Инхибирането на автофагичния процес повишава противомиеломната активност на някои вещества (Hoang, Benavides et al. 2009; Palacios, Martin-Perez et al. 2010). В този контекст е възможно еруфозинът чрез стимулиране на автофагията, да понижава собствената си противомиеломна ефективност и комбинирането му с инхибитори на този процес би могло да доведе до по-добри резултати. Не е изключено обаче 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.

Може да се обобщи, че еруфозинът е способен да предизвиква различен тип клетъчна смърт, като при някои миеломни клетъчни линии активира апоптотични механизми, а при други – неапоптотични.

Получените опитни данни показват, че куркуминът предизвиква апоптоза в миеломните клетки. При еднакви приложени концентрации куркумин, в клетки RPMI-2 се наблюдава по-интензивно активиране на апоптотичните каскади в сравнение с RPMI-8226. Резултатите ни потвърждават и допълват данни на други автори (Bharti, Donato et al. 2003; Park, Аyyarpan et al. 2008).

Данни за протичане на апоптоза бяха получени и след третиране на клетки U-266 и RPMI-2 с As₂O₃. Резултатите ни потвърждават и допълват данни на други автори за различни миеломни клетъчни линии, между които U-266 и RPMI-8226 (Hayashi, Hideshima et al. 2002; Liu, Hilsenbeck et al. 2003; Bajenova, Tang et al. 2004; Kajiguchi, Yamamoto et al. 2006).

Нашите данни показват, че мелфаланът предизвиква апоптоза в миеломни клетки OPM-2 и RPMI-8226. Резултатите потвърждават и допълват публикувани данни за ефектите на Melphalan върху миеломната клетъчна линия MDN (Gomez-Bougie, Oliver et al. 2005).

В рамките на друго направление на експерименталните изследвания беше проучено влиянието на тестваните вещества върху различни сигнални пътища. Известно е, че някои миеломни клетъчни линии се характеризират с висока степен на фосфорилиране и съответно активация на киназата Akt. Сравнително изследване показва например, че такива са линиите OPM-2 и MM.1S, докато при U-266 и RPMI-8226 не се установяват високи нива на p-Akt (Ser473) (Hideshima, Catley et al. 2006). Същото изследване демонстрира, че перифозинът предизвиква дефосфорилиране на p-Akt. Подобен ефект е наблюдаван и при клетъчните линии OPM-1 и INA-6 (Hideshima, Catley et al. 2007). Нашите данни обаче показват, че от трите изследвани миеломни клетъчни линии с най-висока степен на фосфорилиране на 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, но не и в RPMI-8226 или U-266. Освен това при OPM-2 беше наблюдавано и разграждане на Akt с образуване на фрагмент с молекулна маса около 44 kDa, което може да се обясни с действието на активираните каспази. Установено е, че фрагментирането на Akt ускорява апоптозата (Rokudai, Fujita et al. 2000). Липсата на значително дефосфорилиране на p-Akt в клетки RPMI-8226 и U-266 подчертава важността на алтернативните молекулни мишени на АФХ (Gills and Dennis 2009).

Известно е, че Perifosine индуцира фосфорилиране и съответно активиране на JNK в миеломни клетки MM.1S и RPMI-8226 (Hideshima, Catley et al. 2006). Смята се, че активирането на JNK е от ключово значение за способността на АФХ да предизвикват апоптоза. Представените в настоящата дисертация данни показват, че под действие на Erufosine настъпва фосфорилиране на JNK при клетки RPMI-8226 и OPM-2, 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. Други автори стигат до същите заключения, използвайки Perifosine и различни миеломни клетъч-

ни линии (Hideshima, Catley et al. 2007). JNK-зависима апоптоза е наблюдавана и след третиране на лимфобластни клетки СЕМ с перифозин (Chiarini, Del Sole et al. 2008).

Сравнително изследване показва, че повечето миеломни клетъчни линии, вкл. U-266, OPM-2 и RPMI-8226, се характеризират с висока степен на фосфорилиране и съответно активация на киназата ERK (Hideshima, Catley et al. 2006). Същото изследване демонстрира, че перифозинът повишава нивата на фосфорилираните MEK и ERK в миеломни клетки MM.1S. Смята се, че по този начин еруфозинът понижава собствената си противомиеломна ефективност. Стимулирането на ERK от страна на АФХ вероятно е специфично явление при МП, защото в общия случай АФХ действат като инхибитори на ERK (van Blitterswijk and Verheij 2008; Gills and Dennis 2009). 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 и RPMI-8226 беше установено 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.

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, 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 . За сравнение, при миеломни клетки MM.1S не са установени промени в нивото на STAT3 след третиране с Perifosine (Hideshima, Catley et al. 2006). В научната литература липсват данни за роля на STAT3 при реализиране на ефектите на АФХ, но по принцип инхибиторите на STAT3 имат цитотоксичен ефект срещу различни видове тумори, включително ММ (Nelson, Walker et al. 2008; Che, Hou et al. 2009; Lin, Deangelis et al. 2010).

Липидните рафтове са микроучастъци от плазмената мембрана, които са богати на холестерол и сфинголипиди. Протеините, намиращи се в тези структури, са с ограничена възможност за свободна дифузия (Varma and Mayor 1998). Асоциирането и сливането на липидните рафтове може да доведе до концентриране в тях на определени протеини и да повлияе на функциите на тези протеини (Gajate and Mollinedo 2007). Смята се,

че мембранните липидни рафтове могат да служат като платформи за свързване на определени адапторни протеини, необходими за сигналната трансдукция през Fas/CD95, и че агрегацията на липидните рафтове е общ механизъм за регулиране на активността на Fas/CD95 (Gajate and Mollinedo 2001). 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. Понижаването на количеството на каспаза-8 и Fas/CD95 в липидните рафтове на клетки OPM-2 е в контраст с описаните ефекти на еделфозина и перифозина върху миеломната клетъчна линия MM144, а именно обогатяване на липидните рафтове със споменатите протеини (Gajate and Mollinedo 2007; Gajate, Gonzalez-Camacho et al. 2009; Mollinedo, de la Iglesia-Vicente et al. 2010). Наблюдавахме и понижено съдържание на Akt в липидните рафтове на клетки OPM-2, което се различава от данните ни за клетки RPMI-8226, а също и от публикувани данни за клетки Jurkat, при които еделфозинът не предизвиква промени в нивото на Akt в липидните рафтове (Nieto-Miguel, Gajate et al. 2008). 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 (Lambert, Vind-Kezunovic et al. 2006). При клетки SCC61 (сквамозно-клетъчен карцином) разрушаването на липидните рафтове с метил- β -циклодекстрин предизвиква лиганд-независимо димеризиране на Fas/CD95 и образуване на комплекса DISC, което води до активиране на каспаза-8 и настъпване на апоптоза (Bionda, Athias et al. 2008). Еруфозинът не разрушава липидните рафтове на клетки OPM-2, но тъй като „извежда” Fas/CD95 и каспаза-8 от тези мембранни структури, той би могъл да улесни образуването на DISC в други области на плазмената мембрана, имащи по-ниско съдържание на холестерол. Известно е, че холестеролът може да инхибира някои мембранни рецептори, напр. EGFR (Ringerike, Blystad et al. 2002). 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 (Jiang and Liu 2008). Понижаването на съдържанието на Akt в липидните рафтове може да се дължи на взаимодействие на Erufosine с плекстрин-хомоложния домейн на киназата, каквото взаимодействие се предполага за Perifosine (Kondapaka, Singh et al. 2003). Други автори предполагат, че АФХ могат да инхибират продукцията на PIP₃ или да модифицират свойствата му, като така също нарушават локализирането на Akt в мембраната

(Beneteau, Pizon et al. 2008). Необходимо е влиянието на АФХ върху липидните рафтове да се изследва и при други миеломни клетъчни линии.

Независимо от дългата история на мелфалана в терапията на ММ, влиянието му върху основните сигнални пътища не е било целенасочено изследвано. Представените в настоящата дисертация 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. Описаните промени са по-силно изразени след 12-часово въздействие с Melphalan, отколкото след 24-часово. Активирането на JNK и ERK би могло да се обясни с индуцирането на генотоксичен и оксидативен стрес (Kharbanda, Saxena et al. 2000; Yoshida, Miki et al. 2002). Разграждането на Akt и MEK вероятно се дължи на последващото активиране на каспазите. За разлика от OPM-2, при клетки RPMI-8226 не беше наблюдавано 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 бортезомибът инхибират преминаването на NF- κ B в ядрото и така възпрепятстват транскрипцията на NF- κ B-зависимите гени (Bharti, Donato et al. 2003; Ma, Yang et al. 2003; Kamat, Sethi et al. 2007). Куркуминът постига това чрез инхибиране на киназния комплекс IKK (Bharti, Donato et al. 2003; Aggarwal, Ichikawa et al. 2006), а бортезомибът – чрез инхибиране на протеазомата (Nencioni, Grunebach et al. 2007). Нашите изследвания показват, че при дълго въздействие (48 h) куркуминът значително понижава общото количество на NF- κ B p65 в клетки U-266, докато бортезомибът почти не оказва такъв ефект. 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. Активиране на ERK и инхибиране на Akt след третиране с куркумин са наблюдавани при глиомни клетки, като в случая тези промени са свързани с индуциране на автофагична клетъчна смърт (Aoki, Takada et al. 2007). Данни за стимулиране на автофагията бяха получени и от нас при клетки RPMI-8226. След третиране на миеломни клетки U-266 с куркумин е било наблюдавано инхибиране на Akt (Sung, Kunnumakkara et al. 2009) и намаляване на нивото на Bcl-2 (Bharti, Donato et al. 2003), което съответства на нашите данни. В сравнителен аспект, резултатите ни не показват влияние на Bortezomib върху нивото на Bcl-2 в клетки U-266, което също съответства на публикувани данни за тази и други миеломни клетъчни линии (Hideshima, Mitsiades et al. 2003; Gomez-Bougie, Willeme-Toumi et al. 2007). С други думи, въпреки че и двете вещества инхибират NF- κ B, само

куркуминът понижава нивото на Bcl-2. Възможно е този ефект на куркумина да се дължи на допълнителното му свойство да инхибира STAT3 (Bharti, Donato et al. 2003), който също е транскрипционен регулатор на Bcl-2 (Stephanou, Brar et al. 2000).

Получените от нас резултати показват, че куркуминът потиска натрупването на As₂O₃ в клетки OPM-2. Наблюдаваното двукратно понижение на максимално постижимата вътреклетъчна концентрация на As₂O₃ би могло да обясни установения антагонизъм в цитотоксичните ефекти на куркумина и диарсеновия триоксид. Понижено натрупване на As₂O₃ се наблюдава и в случая, когато клетките са били предварително третирани с куркумин за определено време и едва след това са били изложени на As₂O₃ 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 As₂O₃ в човешки клетки е чрез аквапорин-9, член на подгрупата на акваглицеропорините – аквапорини, които освен вода пренасят глицерол и полиоли (Liu, Carbrey et al. 2004; Shinkai, Sumi et al. 2009). От друга страна е известно, че експресията на някои аквапорини се регулира от NF-κB, напр. инхибирането на NF-κB чрез куркумин или други вещества понижава експресията на аквапорин-4 (Ito, Yamamoto et al. 2006; Laird, Sukumari-Ramesh et al. 2010). Предполагайки, че куркуминът би могъл да има подобен ефект и по отношение на аквапорин-9, проведохме съответно изследване, но резултатите не потвърдиха хипотезата. Алтернативно обяснение би могло да се търси в ролята на други аквапорини (Shinkai, Sumi et al. 2009). Не е изключена и вероятността куркуминът да потиска функциите на аквапорин-9 без да влияе върху експресията му.

5. Влияние на различни фактори върху - противомиеломния ефект на изследваните вещества

Известно е, че IL-6 ускорява пролиферацията на миеломните клетки и им придава лекарствена резистентност (Mitsiades, Mitsiades et al. 2004). Такъв ефект беше наблюдаван 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.

Наши резултати показват, че IL-6 има различен ефект върху чувствителността на различните миеломни клетъчни линии към Erufosine. IL-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 IL-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. Повишеният цитотоксичен ефект срещу RPMI-8226 няма задоволително обяснение. Може да се предположи, че едновременното въздействие с IL-6 и еруфозин води до по-силно активиране на сигналния път MEK/ERK, 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 (Aoki, Takada et al. 2007). Публикувани данни показват, че IL-6 не повлиява съществено цитотоксичната ефективност на перифозина спрямо миеломни клетки MM.1S (Hideshima, Catley et al. 2006). Тъй като цитираните автори са провели изследването си само с една миеломна клетъчна линия, различна от използваните от нас, не става ясно дали еруфозинът и перифозинът се повлияват по различен начин от присъствието на IL-6. Поради това изследвахме допълнително влиянието на IL-6 върху цитотоксичната ефективност на Perifosine срещу клетки OPM-2. Получените резултати свидетелстват за 8 до 14-кратно понижаване на цитотоксичността – още по-силно изразен антагонизъм от наблюдавания при използване на Erufosine. С други думи еруфозинът има предимство пред перифозина по отношение на IL-6-индуцираната лекарствена резистентност. Въпреки нея, еруфозинът оказва противомиеломен ефект в концентрация по-ниска от безопасно постижимата в плазмата (Fiegl, Lindner et al. 2008).

Нашите данни показват, че IL-6 понижава противомиеломната активност на куркумин, As₂O₃, Melphalan и Bendamustine и при трите използвани миеломни клетъчни линии. IL-6 понижава цитотоксичността на Bortezomib по отношение на клетки OPM-2 и RPMI-8226, но не и по отношение на U-266. Резултатите ни съответстват на публикувани сведения за влиянието на IL-6 върху противомиеломното действие на мелфалана (Efferth, Fabry et al. 2002). Според други автори IL-6 не индуцира резистентност на МП към куркумин, As₂O₃ и бортезомиб (Hideshima, Richardson et al. 2001; Hayashi, Hideshima et al. 2002; Bharti, Donato et al. 2003). Това би могло да се обясни с използвани различни клетъчни линии и/или опитни протоколи. По отношение на Bendamustine досега не са били провеждани подобни изследвания.

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 (Haylock and Nilsson 2006). 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 (Robbiani, Colon et al. 2007). Според цитираното изследване клетъчната линия RPMI-8226 се характеризира с много високо ниво на иРНК за синтез на OPN, а U-266 и OPM-2 – с ниско. Нашите резултати показват както на РНК-ниво, така и на протеиново ниво, 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, 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 (Osathanon, Bepinyowong et al. 2006). 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. Смята се, че OPN-b и OPN-c имат по-голяма разтворимост, обуславяща повишена способност да стимулират миграцията и метастазирането (He, Mirza et al. 2006).

Публикувани изследвания показват, че OPN стимулира пролиферацията на миеломни клетки U-266 (Abe, Hiura et al. 2004), както и на първични култури от МП в част от случаите на ММ (Caers, Gunthert et al. 2006). Остеопонтинът освен това предпазва миши миеломни клетки 5T33MM от дексаметазон-индуцирана апоптоза (Caers, Gunthert et al. 2006). При нашите експерименти бяха създадени стабилно трансфектирани производни на миеломната клетъчна линия OPM-2, характеризиращи се с повишена експресия на OPN-a или OPN-b. Не беше установено 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. Това би могло да се обясни със способността на OPN чрез свързване с рецептора CD44 да активира сигналния път PI3K/Akt и други кинази (Naor, Nedvetzki et al. 2002). Чувствителността на клетките към куркумин,

As₂O₃ или мелфалан не беше повлияна съществено от повишената експресия на OPN-a или OPN-b. При добавяне на rhOPN към обикновени клетки OPM-2 не беше наблюдавано нито стимулиране на пролиферацията, нито индукция на резистентност към Erufosine, като това вероятно се дължи на лошото качество на използвания рекомбинантен протеин, показващ признаци на разграждане.

Остеопонтинът действа като хемотактичен фактор за миеломните клетки и стимулира миграцията им (Caers, Gunthert et al. 2006). В рамките на настоящата работа беше изследвано дали повишената продукция на OPN от самите миеломни клетки стимулира миграцията им към други хемотаксични фактори, в случая фетален телешки серум. Повлияване на миграцията не беше наблюдавано.

Беше направен опит да се проучи влиянието на съвкупността от разтворими фактори, секретирани от остеобластите, върху химиочувствителността на миеломните клетки. За целта към миеломните клетки беше прибавяна кондиционирана среда от клетки SAOS-2. Получените резултати са доста разнородни. Кондиционираната среда от клетки SAOS-2: понижава цитотоксичността на Erufosine за клетки OPM-2, повишава я за клетки RPMI-8226 и не я променя по отношение на U-266; понижава цитотоксичността на Melphalan за клетки U-266, повишава я за клетки RPMI-8226 и не я променя по отношение на OPM-2; повишава цитотоксичността на куркумин за клетки OPM-2.

Изследвания върху миеломната клетъчна линия RPMI-8226 показват, че свързването на матриксния гликопротеин фибронектин със съответните клетъчни рецептори обуславя възникване на резистентност към цитотоксичното действие на Melphalan и Doxorubicin (Damiano, Cress et al. 1999; Hazlehurst, Damiano et al. 2000). Според нашите 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 OPM-2 и по-силно при U-266.

U0126 е инхибитор на киназата MEK, който има собствен противомиеломен ефект и потенцира цитотоксичния ефект на Perifosine срещу клетки MM.1S и MM.1R (Hideshima, Catley et al. 2006). AZD6244 и AS703026 са нови, по-активни и по-селективни инхибитори на MEK, които също имат противомиеломен ефект и си синергизират с Perifosine, Dexamethasone, Lenalidomide и Bortezomib (Tai, Fulciniti et al. 2007; Kim, Kong et al. 2010). Нашите данни показват, че миеломните клетъчни линии U-266, OPM-2 и RPMI-8226 имат сходна чувствителност към U0126. При OPM-2 е налице синергизъм в действието на U0126 и Erufosine, 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. Резултатите 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 (Favata, Horiuchi et al. 1998). 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 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 (Aoki, Takada et al. 2007; Kandouz, Haidara et al. 2010). Вероятно такъв е механизмът и при U-266. Нужни са допълнителни изследвания за доказване на тази хипотеза.

Известно е, че Bcl-X_L понижава чувствителността на лимфомни и глиомни клетки към АФХ-индуцирана апоптоза (Naumann, Wischhusen et al. 2004; Handrick, Rudner et al. 2005). 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 (Gajate and Mollinedo 2007). В рамките на настоящата дисертация 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 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. 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. Подобно изследване при три миеломни клетъчни линии показва, че потискането на експресията на Bcl-X_L няма собствен антипролиферативен ефект, нито потенцира действието на дексаметазона, докато потискането на експресията на Mcl-1 има собствен антипролиферативен ефект и потенцира действието на дексаметазона (Derenne, Monia et al. 2002). От друга страна, АВТ-737 (инхибитор на Bcl-X_L и другите протеини от семейството на Bcl-2) има противомиеломно действие *in vitro* и *in vivo*, потенцира действието на дексаметазона и участва в адитивни взаимодействия с Melphalan и Bortezomib (Chauhan, Velankar

et al. 2007; Trudel, Stewart et al. 2007). АВТ-737, въпреки че не инхибира пряко Mcl-1, по косвен път потиска експресията му (Kline, Rajkumar et al. 2007). Тези данни показват, че инхибирането само на Bcl-X_L не е достатъчно, за да се потенцира противомиеломният 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, например чрез АВТ-737.

VI. 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 хемопое-тични 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 антитяло 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 антитяло срещу Vcl-2.

5. Комбинациите на еруфозин или куркумин с бендамустин, мелфалан или бортезомиб могат да се окачествят като синергистични (суперадитивни) по отношение на постиганя 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 окачествят 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-κB 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 Vcl-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.

VII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abe, M., K. Hiura, J. Wilde, A. Shioyasono, K. Moriyama, et al. (2004). "Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion." Blood **104**(8): 2484-91.
2. Aggarwal, B. B., A. Kumar and A. C. Bharti (2003). "Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies." Anticancer Res **23**(1A): 363-98.
3. Aggarwal, B. B. and S. Shishodia (2004). "Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning." Ann N Y Acad Sci **1030**: 434-41.
4. Aggarwal, R., I. M. Ghobrial and G. D. Roodman (2006). "Chemokines in multiple myeloma." Exp Hematol **34**(10): 1289-95.
5. Aggarwal, S., H. Ichikawa, Y. Takada, S. K. Sandur, S. Shishodia, et al. (2006). "Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B kinase and Akt activation." Mol Pharmacol **69**(1): 195-206.
6. Agresta, M., P. D'Arrigo, E. Fasoli, D. Losi, G. Pedrocchi-Fantoni, et al. (2003). "Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines." Chem Phys Lipids **126**(2): 201-10.
7. Alaikov, T., S. M. Konstantinov, T. Tzanova, K. Dinev, M. Topashka-Ancheva, et al. (2007). "Antineoplastic and anticlastogenic properties of curcumin." Ann N Y Acad Sci **1095**: 355-70.
8. Amundson, S. A., T. G. Myers, D. Scudiero, S. Kitada, J. C. Reed, et al. (2000). "An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines." Cancer Res **60**(21): 6101-10.
9. Andreesen, R., M. Modolell, H. U. Weltzien, H. Eibl, H. H. Common, et al. (1978). "Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids." Cancer Res **38**(11 Pt 1): 3894-9.
10. Aoki, H., Y. Takada, S. Kondo, R. Sawaya, B. B. Aggarwal, et al. (2007). "Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways." Mol Pharmacol **72**(1): 29-39.
11. Armand, J. P., A. K. Burnett, J. Drach, J. L. Harousseau, B. Lowenberg, et al. (2007). "The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib." Oncologist **12**(3): 281-90.
12. Arndt, D., R. Zeisig, I. Eue, B. Sternberg and I. Fichtner (1997). "Antineoplastic activity of sterically stabilized alkylphosphocholine liposomes in human breast carcinomas." Breast Cancer Res Treat **43**(3): 237-46.
13. Attal, M., J. L. Harousseau, S. Leyvraz, C. Doyen, C. Hulin, et al. (2006). "Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma." Blood **108**(10): 3289-94.
14. Attal, M., J. L. Harousseau, A. M. Stoppa, J. J. Sotto, J. G. Fuzibet, et al. (1996). "A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome." N Engl J Med **335**(2): 91-7.
15. Au, W. Y. and Y. L. Kwong (2008). "Arsenic trioxide: safety issues and their management." Acta Pharmacol Sin **29**(3): 296-304.
16. Badros, A. Z., O. Goloubeva, A. P. Rapoport, B. Ratterree, N. Gahres, et al. (2005). "Phase II study of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with dexamethasone and thalidomide in relapsed multiple myeloma patients." J Clin Oncol **23**(18): 4089-99.
17. Bagchi, D. and H. G. Preuss (2005). *Phytopharmaceuticals in cancer chemoprevention*. Boca Raton, Fla., CRC Press: 665 p., [4] colored plates.

18. Bajenova, O., B. Tang, R. Pearce, R. Feinman, B. H. Childs, et al. (2004). "RIP kinase is involved in arsenic-induced apoptosis in multiple myeloma cells." Apoptosis **9**(5): 561-71.
19. Bataille, R., M. Boccadoro, B. Klein, B. Durie and A. Pileri (1992). "C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system." Blood **80**(3): 733-7.
20. Bataille, R., B. G. Durie and J. Grenier (1983). "Serum beta2 microglobulin and survival duration in multiple myeloma: a simple reliable marker for staging." Br J Haematol **55**(3): 439-47.
21. Beneteau, M., M. Pizon, B. Chaigne-Delalande, S. Daburon, P. Moreau, et al. (2008). "Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway." Mol Cancer Res **6**(4): 604-13.
22. Bengmark, S., M. D. Mesa and A. Gil (2009). "Plant-derived health: the effects of turmeric and curcuminoids." Nutr Hosp **24**(3): 273-81.
23. Bergsagel, P. L., W. M. Kuehl, F. Zhan, J. Sawyer, B. Barlogie, et al. (2005). "Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma." Blood **106**(1): 296-303.
24. Berkova, Z., R. H. Tao and F. Samaniego (2010). "Milatuzumab - a promising new immunotherapeutic agent." Expert Opin Investig Drugs **19**(1): 141-9.
25. Bharti, A. C., N. Donato and B. B. Aggarwal (2003). "Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells." J Immunol **171**(7): 3863-71.
26. Bharti, A. C., N. Donato, S. Singh and B. B. Aggarwal (2003). "Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and I kappa B kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis." Blood **101**(3): 1053-62.
27. Bharti, A. C., S. Shishodia, J. M. Reuben, D. Weber, R. Alexanian, et al. (2004). "Nuclear factor-kappa B and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis." Blood **103**(8): 3175-84.
28. Bharti, A. C., Y. Takada and B. B. Aggarwal (2004). "Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF-kappa B ligand-induced NF-kappa B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis." J Immunol **172**(10): 5940-7.
29. Binet, F., F. Antoine and D. Girard (2009). "Interaction between arsenic trioxide and human primary cells: emphasis on human cells of myeloid origin." Inflamm Allergy Drug Targets **8**(1): 21-7.
30. Bionda, C., A. Athias, D. Poncet, G. Alphonse, A. Guezguez, et al. (2008). "Differential regulation of cell death in head and neck cell carcinoma through alteration of cholesterol levels in lipid rafts microdomains." Biochem Pharmacol **75**(3): 761-72.
31. Blade, J. and L. Rosinol (2007). "Complications of multiple myeloma." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1231-46, xi.
32. Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.
33. Caers, J., U. Gunthert, H. De Raeve, E. Van Valckenborgh, E. Menu, et al. (2006). "The involvement of osteopontin and its receptors in multiple myeloma cell survival, migration and invasion in the murine 5T33MM model." Br J Haematol **132**(4): 469-77.
34. Catley, L., T. Hideshima, D. Chauhan, P. Neri, P. Tassone, et al. (2007). "Alkyl phospholipid perfosine induces myeloid hyperplasia in a murine myeloma model." Exp Hematol **35**(7): 1038-46.
35. Cavo, M., E. Zamagni, P. Tosi, P. Tacchetti, C. Cellini, et al. (2005). "Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma." Blood **106**(1): 35-9.
36. Chanan-Khan, A. A., R. Niesvizky, R. J. Hohl, T. M. Zimmerman, N. P. Christiansen, et al. (2009). "Phase III randomised study of dexamethasone with or without oblimersen sodium for patients with advanced multiple myeloma." Leuk Lymphoma **50**(4): 559-65.

37. Chauhan, D., L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, et al. (2005). "A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib." *Cancer Cell* **8**(5): 407-19.
38. Chauhan, D., T. Hideshima and K. C. Anderson (2006). "A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy." *Br J Cancer* **95**(8): 961-5.
39. Chauhan, D., M. Velankar, M. Brahmandam, T. Hideshima, K. Podar, et al. (2007). "A novel Bcl-2/Bcl-X(L)/Bcl-w inhibitor ABT-737 as therapy in multiple myeloma." *Oncogene* **26**(16): 2374-80.
40. Che, Y., S. Hou, Z. Kang and Q. Lin (2009). "Serenoa repens induces growth arrest and apoptosis of human multiple myeloma cells via inactivation of STAT 3 signaling." *Oncol Rep* **22**(2): 377-83.
41. Chen, Y. R. and T. H. Tan (1998). "Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin." *Oncogene* **17**(2): 173-8.
42. Cheng, E. H., D. G. Kirsch, R. J. Clem, R. Ravi, M. B. Kastan, et al. (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." *Science* **278**(5345): 1966-8.
43. Chiarini, F., M. Del Sole, S. Mongiorgi, G. C. Gaboardi, A. Cappellini, et al. (2008). "The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism." *Leukemia* **22**(6): 1106-16.
44. Child, J. A., G. J. Morgan, F. E. Davies, R. G. Owen, S. E. Bell, et al. (2003). "High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma." *N Engl J Med* **348**(19): 1875-83.
45. Chng, W. J., L. G. Lau, N. Yusof and B. M. Mow (2005). "Targeted therapy in multiple myeloma." *Cancer Control* **12**(2): 91-104.
46. Choi, S. J., Y. Oba, Y. Gazitt, M. Alsina, J. Cruz, et al. (2001). "Antisense inhibition of macrophage inflammatory protein 1-alpha blocks bone destruction in a model of myeloma bone disease." *J Clin Invest* **108**(12): 1833-41.
47. Crawley, C., S. Iacobelli, B. Bjorkstrand, J. F. Apperley, D. Niederwieser, et al. (2007). "Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning." *Blood* **109**(8): 3588-94.
48. Croft, S. L., R. A. Neal, W. Pendergast and J. H. Chan (1987). "The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*." *Biochem Pharmacol* **36**(16): 2633-6.
49. Damiano, J. S., A. E. Cress, L. A. Hazlehurst, A. A. Shtil and W. S. Dalton (1999). "Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines." *Blood* **93**(5): 1658-67.
50. Dar, A., P. Goichberg, V. Shinder, A. Kalinkovich, O. Kollet, et al. (2005). "Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells." *Nat Immunol* **6**(10): 1038-46.
51. Dennie, T. W. and J. M. Kolesar (2009). "Bendamustine for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and rituximab-refractory, indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma." *Clin Ther* **31 Pt 2**: 2290-311.
52. Derenne, S., B. Monia, N. M. Dean, J. K. Taylor, M. J. Rapp, et al. (2002). "Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells." *Blood* **100**(1): 194-9.
53. Dimopoulos, M. A., C. Chen, A. Spencer, R. Niesvizky, M. Attal, et al. (2009). "Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma." *Leukemia* **23**(11): 2147-52.
54. Dispenzieri, A. (2007). "Complications of myeloma therapy." *Hematol Oncol Clin North Am* **21**(6): 1247-73, xi.

55. Dorlo, T. P., P. P. van Thiel, A. D. Huitema, R. J. Keizer, H. J. de Vries, et al. (2008). "Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients." Antimicrob Agents Chemother **52**(8): 2855-60.
56. Doss, D. S. (2006). "Advances in oral therapy in the treatment of multiple myeloma." Clin J Oncol Nurs **10**(4): 514-20.
57. Drexler, H. G. (2001). The leukemia-lymphoma cell line : factsbook. San Diego, Calif., Academic Press.
58. Durie, B. G. and S. E. Salmon (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival." Cancer **36**(3): 842-54.
59. Durie, B. G., D. Stock-Novack, S. E. Salmon, P. Finley, J. Beckord, et al. (1990). "Prognostic value of pretreatment serum beta 2 microglobulin in myeloma: a Southwest Oncology Group Study." Blood **75**(4): 823-30.
60. Efferth, T., U. Fabry and R. Osieka (2002). "Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells." Anticancer Res **22**(1A): 231-4.
61. Eibl, H., D. Arnold, H. U. Weltzien and O. Westphal (1967). "[On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs]." Justus Liebigs Ann Chem **709**: 226-30.
62. Eibl, K. H., B. Banas, C. L. Schoenfeld, C. A. May, A. S. Neubauer, et al. (2003). "Alkylphosphocholines inhibit proliferation of human retinal pigment epithelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(8): 3556-61.
63. Eibl, K. H., D. Kook, S. Priglinger, C. Haritoglou, A. Yu, et al. (2006). "Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by alkylphosphocholines." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(1): 364-70.
64. Eibl, K. H., G. P. Lewis, K. Betts, K. A. Linberg, A. Gandorfer, et al. (2007). "The effect of alkylphosphocholines on intraretinal proliferation initiated by experimental retinal detachment." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(3): 1305-11.
65. Erdlenbruch, B., V. Jendrossek, A. Gerriets, F. Vetterlein, H. Eibl, et al. (1999). "Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration." Cancer Chemother Pharmacol **44**(6): 484-90.
66. Fang, J., J. Lu and A. Holmgren (2005). "Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity." J Biol Chem **280**(26): 25284-90.
67. Fauci, A. S. and T. R. Harrison (2008). Harrison's principles of internal medicine. New York ; London, McGraw-Hill Medical.
68. Favata, M. F., K. Y. Horiuchi, E. J. Manos, A. J. Daulerio, D. A. Stradley, et al. (1998). "Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase." J Biol Chem **273**(29): 18623-32.
69. Feinman, R., J. Koury, M. Thames, B. Barlogie, J. Epstein, et al. (1999). "Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2." Blood **93**(9): 3044-52.
70. Fichtner, I., R. Zeisig, H. Naundorf, S. Jungmann, D. Arndt, et al. (1994). "Antineoplastic activity of alkylphosphocholines (APC) in human breast carcinomas in vivo and in vitro; use of liposomes." Breast Cancer Res Treat **32**(3): 269-79.
71. Fiegl, M., L. H. Lindner, M. Juergens, H. Eibl, W. Hiddemann, et al. (2008). "Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: single activity and combination with other antileukemic drugs." Cancer Chemother Pharmacol **62**(2): 321-9.
72. Fleer, E. A., C. Unger, D. J. Kim and H. Eibl (1987). "Metabolism of ether phospholipids and analogs in neoplastic cells." Lipids **22**(11): 856-61.
73. Fogh, J. (1975). Human tumor cells in vitro. New York, Plenum Press.
74. Folmer, F., R. Blasius, F. Morceau, J. Tabudravu, M. Dicato, et al. (2006). "Inhibition of TNFalpha-induced activation of nuclear factor kappaB by kava (Piper methysticum) derivatives." Biochem Pharmacol **71**(8): 1206-18.

75. Fonseca, R. and J. San Miguel (2007). "Prognostic factors and staging in multiple myeloma." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1115-40, ix.
76. Fu, L., Y. A. Kim, X. Wang, X. Wu, P. Yue, et al. (2009). "Perifosine inhibits mammalian target of rapamycin signaling through facilitating degradation of major components in the mTOR axis and induces autophagy." Cancer Res **69**(23): 8967-76.
77. Gajate, C., F. An and F. Mollinedo (2003). "Rapid and selective apoptosis in human leukemic cells induced by Aplidine through a Fas/CD95- and mitochondrial-mediated mechanism." Clin Cancer Res **9**(4): 1535-45.
78. Gajate, C., F. Gonzalez-Camacho and F. Mollinedo (2009). "Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways." Biochem Biophys Res Commun **380**(4): 780-4.
79. Gajate, C. and F. Mollinedo (2001). "The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells." Blood **98**(13): 3860-3.
80. Gajate, C. and F. Mollinedo (2007). "Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts." Blood **109**(2): 711-9.
81. Gandhi, V. and J. A. Burger (2009). "Bendamustine in B-Cell Malignancies: The New 46-Year-Old Kid on the Block." Clin Cancer Res **15**(24): 7456-7461.
82. Gao, W. R. and J. Hou (2005). "[Effect of 2-methoxyestradiol on proliferation and apoptosis of myeloma cell lines.]" Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **13**(2): 293-7.
83. Georgieva, M. C., S. M. Konstantinov, M. Topashka-Ancheva and M. R. Berger (2002). "Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells." Cancer Lett **182**(2): 163-74.
84. Gills, J. J. and P. A. Dennis (2009). "Perifosine: update on a novel Akt inhibitor." Curr Oncol Rep **11**(2): 102-10.
85. Giuliani, N., S. Colla, F. Morandi, M. Lazzaretti, R. Sala, et al. (2005). "Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation." Blood **106**(7): 2472-83.
86. Glasmacher, A., C. Hahn, F. Hoffmann, R. Naumann, H. Goldschmidt, et al. (2006). "A systematic review of phase-II trials of thalidomide monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma." Br J Haematol **132**(5): 584-93.
87. Goel, A., A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal (2008). "Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic." Biochem Pharmacol **75**(4): 787-809.
88. Golombick, T., T. H. Diamond, V. Badmaev, A. Manoharan and R. Ramakrishna (2009). "The potential role of curcumin in patients with monoclonal gammopathy of undefined significance--its effect on paraproteinemia and the urinary N-telopeptide of type I collagen bone turnover marker." Clin Cancer Res **15**(18): 5917-22.
89. Gomez-Bougie, P., L. Oliver, S. Le Gouill, R. Bataille and M. Amiot (2005). "Melphalan-induced apoptosis in multiple myeloma cells is associated with a cleavage of Mcl-1 and Bim and a decrease in the Mcl-1/Bim complex." Oncogene **24**(54): 8076-9.
90. Gomez-Bougie, P., S. Wulleme-Toumi, E. Menoret, V. Trichet, N. Robillard, et al. (2007). "Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma." Cancer Res **67**(11): 5418-24.
91. Greco, W. R., H. Faessel and L. Lévassieur (1996). "The search for cytotoxic synergy between anticancer agents: a case of Dorothy and the ruby slippers?" J Natl Cancer Inst **88**(11): 699-700.
92. Greipp, P. R., J. San Miguel, B. G. Durie, J. J. Crowley, B. Barlogie, et al. (2005). "International staging system for multiple myeloma." J Clin Oncol **23**(15): 3412-20.
93. Grosman, N. (2001). "Similar effects of ether phospholipids, PAF and lyso-PAF on the Ca(2+)-ATPase activity of rat brain synaptosomes and leukocyte membranes." Int Immunopharmacol **1**(7): 1321-9.

94. Handrick, R., J. Rudner, I. Muller, H. Eibl, C. Belka, et al. (2005). "Bcl-2 mediated inhibition of erucylphosphocholine-induced apoptosis depends on its subcellular localisation." Biochem Pharmacol **70**(6): 837-50.
95. Housseau, J. L. (2007). "Role of stem cell transplantation." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1157-74, x.
96. Housseau, J. L., P. Moreau, M. Attal, T. Facon and H. Avet-Loiseau (2005). "Stem-cell transplantation in multiple myeloma." Best Pract Res Clin Haematol **18**(4): 603-18.
97. Hatcher, H., R. Planalp, J. Cho, F. M. Torti and S. V. Torti (2008). "Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials." Cell Mol Life Sci **65**(11): 1631-52.
98. Hayashi, T., T. Hideshima, M. Akiyama, P. Richardson, R. L. Schlossman, et al. (2002). "Arsenic trioxide inhibits growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment." Mol Cancer Ther **1**(10): 851-60.
99. Haylock, D. N. and S. K. Nilsson (2006). "Osteopontin: a bridge between bone and blood." Br J Haematol **134**(5): 467-74.
100. Hazlehurst, L. A., J. S. Damiano, I. Buyuksal, W. J. Pledger and W. S. Dalton (2000). "Adhesion to fibronectin via beta1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR)." Oncogene **19**(38): 4319-27.
101. He, B., M. Mirza and G. F. Weber (2006). "An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells." Oncogene **25**(15): 2192-202.
102. Henke, G., L. H. Lindner, M. Vogeser, H. J. Eibl, J. Worner, et al. (2009). "Pharmacokinetics and biodistribution of Erufosine in nude mice--implications for combination with radiotherapy." Radiat Oncol **4**: 46.
103. Hideshima, T. and K. C. Anderson (2007). "Preclinical studies of novel targeted therapies." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1071-91, viii-ix.
104. Hideshima, T., L. Catley, N. Raje, D. Chauhan, K. Podar, et al. (2007). "Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells." Br J Haematol **138**(6): 783-91.
105. Hideshima, T., L. Catley, H. Yasui, K. Ishitsuka, N. Raje, et al. (2006). "Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells." Blood **107**(10): 4053-62.
106. Hideshima, T., D. Chauhan, P. Richardson, C. Mitsiades, N. Mitsiades, et al. (2002). "NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma." J Biol Chem **277**(19): 16639-47.
107. Hideshima, T., C. Mitsiades, M. Akiyama, T. Hayashi, D. Chauhan, et al. (2003). "Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341." Blood **101**(4): 1530-4.
108. Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V. J. Palombella, P. J. Elliott, et al. (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." Cancer Res **61**(7): 3071-6.
109. Hilgard, P., T. Klenner, J. Stekar and C. Unger (1993). "Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents." Cancer Chemother Pharmacol **32**(2): 90-5.
110. Hjertner, O., T. Standal, M. Borset, A. Sundan and A. Waage (2006). "Bone disease in multiple myeloma." Med Oncol **23**(4): 431-41.
111. Hoang, B., A. Benavides, Y. Shi, P. Frost and A. Lichtenstein (2009). "Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability." Mol Cancer Ther **8**(7): 1974-84.
112. Hossain, K., A. A. Akhand, M. Kato, J. Du, K. Takeda, et al. (2000). "Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of c-Jun amino-terminal kinase." J Immunol **165**(8): 4290-7.
113. Hurt, E. M., A. Wiestner, A. Rosenwald, A. L. Shaffer, E. Campo, et al. (2004). "Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma." Cancer Cell **5**(2): 191-9.

114. Huston, A., X. Leleu, X. Jia, A. S. Moreau, H. T. Ngo, et al. (2008). "Targeting Akt and heat shock protein 90 produces synergistic multiple myeloma cell cytotoxicity in the bone marrow microenvironment." *Clin Cancer Res* **14**(3): 865-74.
115. Ito, H., N. Yamamoto, H. Arima, H. Hirate, T. Morishima, et al. (2006). "Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes." *J Neurochem* **99**(1): 107-18.
116. Jendrossek, V., K. Hammersen, B. Erdlenbruch, W. Kugler, R. Krugener, et al. (2002). "Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro." *Cancer Chemother Pharmacol* **50**(1): 71-9.
117. Jendrossek, V. and R. Handrick (2003). "Membrane targeted anticancer drugs: potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers." *Curr Med Chem Anticancer Agents* **3**(5): 343-53.
118. Jendrossek, V., I. Muller, H. Eibl and C. Belka (2003). "Intracellular mediators of erucylphosphocholine-induced apoptosis." *Oncogene* **22**(17): 2621-31.
119. Jernberg-Wiklund, H., M. Pettersson, M. Carlsson and K. Nilsson (1992). "Increase in interleukin 6 (IL-6) and IL-6 receptor expression in a human multiple myeloma cell line, U-266, during long-term in vitro culture and the development of a possible autocrine IL-6 loop." *Leukemia* **6**(4): 310-8.
120. Jiang, B. H. and L. Z. Liu (2008). "PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* **1784**(1): 150-8.
121. Jimenez-Lopez, J. M., P. Rios-Marco, C. Marco, J. L. Segovia and M. P. Carrasco (2010). "Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids." *Lipids Health Dis* **9**: 33.
122. Joazeiro, C. A., K. C. Anderson and T. Hunter (2006). "Proteasome inhibitor drugs on the rise." *Cancer Res* **66**(16): 7840-2.
123. Jurenka, J. S. (2009). "Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research." *Altern Med Rev* **14**(2): 141-53.
124. Kajiguchi, T., K. Yamamoto, S. Iida, R. Ueda, N. Emi, et al. (2006). "Sustained activation of c-jun-N-terminal kinase plays a critical role in arsenic trioxide-induced cell apoptosis in multiple myeloma cell lines." *Cancer Sci* **97**(6): 540-5.
125. Kamat, A. M., G. Sethi and B. B. Aggarwal (2007). "Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells." *Mol Cancer Ther* **6**(3): 1022-30.
126. Kandouz, M., K. Haidara, J. Zhao, M. L. Brisson and G. Batist (2010). "The EphB2 tumor suppressor induces autophagic cell death via concomitant activation of the ERK1/2 and PI3K pathways." *Cell Cycle* **9**(2): 398-407.
127. Karasavvas, N., J. M. Carcamo, G. Stratis and D. W. Golde (2005). "Vitamin C protects HL60 and U266 cells from arsenic toxicity." *Blood* **105**(10): 4004-12.
128. Kastiris, E., A. Charidimou, A. Varkaris and M. A. Dimopoulos (2009). "Targeted therapies in multiple myeloma." *Target Oncol* **4**(1): 23-36.
129. Kastiris, E., C. S. Mitsiades, M. A. Dimopoulos and P. G. Richardson (2007). "Management of relapsed and relapsed refractory myeloma." *Hematol Oncol Clin North Am* **21**(6): 1175-215, x.
130. Katagiri, S., T. Yonezawa, J. Kuyama, Y. Kanayama, K. Nishida, et al. (1985). "Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma." *Int J Cancer* **36**(2): 241-6.
131. Kawamura, C., M. Kizaki, K. Yamato, H. Uchida, Y. Fukuchi, et al. (2000). "Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3." *Blood* **96**(6): 2005-11.
132. Kenealy, M. and H. M. Prince (2006). "Current status of new drugs for the treatment of patients with multiple myeloma." *Intern Med J* **36**(12): 781-9.

133. Kenealy, M. K., H. M. Prince and D. Honemann (2006). "Tumor lysis syndrome early after treatment with bortezomib for multiple myeloma." Pharmacotherapy **26**(8): 1205-6; discussion 1206.
134. Kharbanda, S., S. Saxena, K. Yoshida, P. Pandey, M. Kaneki, et al. (2000). "Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage." J Biol Chem **275**(1): 322-7.
135. Kim, K., S. Y. Kong, M. Fulciniti, X. Li, W. Song, et al. (2010). "Blockade of the MEK/ERK signalling cascade by AS703026, a novel selective MEK1/2 inhibitor, induces pleiotropic anti-myeloma activity in vitro and in vivo." Br J Haematol **149**(4): 537-49.
136. Kline, M. P., S. V. Rajkumar, M. M. Timm, T. K. Kimlinger, J. L. Haug, et al. (2007). "ABT-737, an inhibitor of Bcl-2 family proteins, is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells." Leukemia **21**(7): 1549-60.
137. Koldehoff, M., D. W. Beelen and A. H. Elmaagacli (2008). "Small-molecule inhibition of proteasome and silencing by vascular endothelial cell growth factor-specific siRNA induce additive antitumor activity in multiple myeloma." J Leukoc Biol **84**(2): 561-76.
138. Kondapaka, S. B., S. S. Singh, G. P. Dasmahapatra, E. A. Sausville and K. K. Roy (2003). "Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation." Mol Cancer Ther **2**(11): 1093-103.
139. Konigs, S. K., C. P. Pallasch, L. H. Lindner, J. Schwamb, A. Schulz, et al. (2010). "Erufosine, a novel alkylphosphocholine, induces apoptosis in CLL through a caspase-dependent pathway." Leuk Res.
140. Konstantinov, S. M. and M. R. Berger (1999). "Human urinary bladder carcinoma cell lines respond to treatment with alkylphosphocholines." Cancer Lett **144**(2): 153-60.
141. Konstantinov, S. M., H. Eibl and M. R. Berger (1999). "BCR-ABL influences the antileukaemic efficacy of alkylphosphocholines." Br J Haematol **107**(2): 365-80.
142. Konstantinov, S. M., M. C. Georgieva, M. Topashka-Ancheva, H. Eibl and M. R. Berger (2002). "Combination with an antisense oligonucleotide synergistically improves the antileukemic efficacy of erucylphospho-N,N,N-trimethylpropylammonium in chronic myeloid leukemia cell lines." Mol Cancer Ther **1**(10): 877-84.
143. Konstantinov, S. M., M. Topashka-Ancheva, A. Benner and M. R. Berger (1998). "Alkylphosphocholines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells." Int J Cancer **77**(5): 778-86.
144. Kotting, J., M. R. Berger, C. Unger and H. Eibl (1992). "Alkylphosphocholines: influence of structural variation on biodistribution at antineoplastically active concentrations." Cancer Chemother Pharmacol **30**(2): 105-12.
145. Kyle, R. A., M. A. Gertz, T. E. Witzig, J. A. Lust, M. Q. Lacy, et al. (2003). "Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma." Mayo Clin Proc **78**(1): 21-33.
146. Kyle, R. A., T. M. Therneau, S. V. Rajkumar, D. R. Larson, M. F. Plevak, et al. (2006). "Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance." N Engl J Med **354**(13): 1362-9.
147. Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-76.
148. Lacy, M. Q., S. R. Hayman, M. A. Gertz, A. Dispenzieri, F. Buadi, et al. (2009). "Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma." J Clin Oncol **27**(30): 5008-14.
149. Laird, M. D., S. Sukumari-Ramesh, A. E. Swift, S. E. Meiler, J. R. Vender, et al. (2010). "Curcumin attenuates cerebral edema following traumatic brain injury in mice: a possible role for aquaporin-4?" J Neurochem **113**(3): 637-48.
150. Lambert, S., D. Vind-Kezunovic, S. Karvinen and R. Gniadecki (2006). "Ligand-independent activation of the EGFR by lipid raft disruption." J Invest Dermatol **126**(5): 954-62.
151. Landis-Piwowar, K. R., V. Milacic, D. Chen, H. Yang, Y. Zhao, et al. (2006). "The proteasome as a potential target for novel anticancer drugs and chemosensitizers." Drug Resist Updat **9**(6): 263-73.

152. Laubach, J. P., A. Mahindra, C. S. Mitsiades, R. L. Schlossman, N. C. Munshi, et al. (2009). "The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma." *Leukemia* **23**(12): 2222-32.
153. Le Gouill, S., K. Podar, J. L. Harousseau and K. C. Anderson (2004). "Mcl-1 regulation and its role in multiple myeloma." *Cell Cycle* **3**(10): 1259-62.
154. Leleu, X., X. Jia, J. Runnels, H. T. Ngo, A. S. Moreau, et al. (2007). "The Akt pathway regulates survival and homing in Waldenstrom macroglobulinemia." *Blood* **110**(13): 4417-26.
155. Lentzsch, S., L. A. Ehrlich and G. D. Roodman (2007). "Pathophysiology of multiple myeloma bone disease." *Hematol Oncol Clin North Am* **21**(6): 1035-49, viii.
156. Leoni, L. M., B. Bailey, J. Reifert, H. H. Bendall, R. W. Zeller, et al. (2008). "Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents." *Clin Cancer Res* **14**(1): 309-17.
157. Lin, L., S. Deangelis, E. Foust, J. Fuchs, C. Li, et al. (2010). "A novel small molecule inhibits STAT3 phosphorylation and DNA binding activity and exhibits potent growth suppressive activity in human cancer cells." *Mol Cancer* **9**: 217.
158. Liu, Q., S. Hilsenbeck and Y. Gazitt (2003). "Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL." *Blood* **101**(10): 4078-87.
159. Liu, Z., J. M. Carbrey, P. Agre and B. P. Rosen (2004). "Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins." *Biochem Biophys Res Commun* **316**(4): 1178-85.
160. Lucas, L., R. Hernandez-Alcoceba, V. Penalva and J. C. Lacal (2001). "Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity." *Oncogene* **20**(9): 1110-7.
161. Ludwig, H., M. Beksac, J. Blade, M. Boccadoro, J. Cavenagh, et al. (2010). "Current multiple myeloma treatment strategies with novel agents: a European perspective." *Oncologist* **15**(1): 6-25.
162. Lukac, M., J. Mojzis, G. Mojzisova, M. Mrva, F. Ondriska, et al. (2009). "Dialkylamino and nitrogen heterocyclic analogues of hexadecylphosphocholine and cetyltrimethylammonium bromide: effect of phosphate group and environment of the ammonium cation on their biological activity." *Eur J Med Chem* **44**(12): 4970-7.
163. Ma, C. X., M. Q. Lacy, J. F. Rompala, A. Dispenzieri, S. V. Rajkumar, et al. (2004). "Acquired Fanconi syndrome is an indolent disorder in the absence of overt multiple myeloma." *Blood* **104**(1): 40-2.
164. Ma, M. H., H. H. Yang, K. Parker, S. Manyak, J. M. Friedman, et al. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents." *Clin Cancer Res* **9**(3): 1136-44.
165. Marriott, J. B., I. A. Clarke, K. Dredge, G. Muller, D. Stirling, et al. (2002). "Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells." *Clin Exp Immunol* **130**(1): 75-84.
166. Martelli, A. M., V. Papa, P. L. Tazzari, F. Ricci, C. Evangelisti, et al. (2010). "Erucylphosphocholine, the first intravenously applicable alkylphosphocholine, is cytotoxic to acute myelogenous leukemia cells through JNK- and PP2A-dependent mechanisms." *Leukemia* **24**(4): 687-98.
167. Martinova, Y., M. Topashka-Ancheva, S. Konstantinov, S. Petkova, M. Karaivanova, et al. (2006). "Miltefosine decreases the cytotoxic effect of epirubicin and cyclophosphamide on mouse spermatogenic, thymic and bone marrow cells." *Arch Toxicol* **80**(1): 27-33.
168. Matsuoka, Y., G. E. Moore, Y. Yagi and D. Pressman (1967). "Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma." *Proc Soc Exp Biol Med* **125**(4): 1246-50.
169. Mayo, M. W., C. Y. Wang, S. S. Drouin, L. V. Madrid, A. F. Marshall, et al. (1999). "WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene." *EMBO J* **18**(14): 3990-4003.

170. Melchert, M. and A. List (2007). "The thalidomide saga." Int J Biochem Cell Biol.
171. Menoret, E., P. Gomez-Bougie, A. Geffroy-Luseau, S. Daniels, P. Moreau, et al. (2006). "Mcl-1L cleavage is involved in TRAIL-R1- and TRAIL-R2-mediated apoptosis induced by HGS-ETR1 and HGS-ETR2 human mAbs in myeloma cells." Blood **108**(4): 1346-52.
172. Mihelic, R., J. L. Kaufman and S. Lonial (2007). "Maintenance therapy in multiple myeloma." Leukemia.
173. Mitsiades, C. S., T. Hideshima, D. Chauhan, D. W. McMillin, S. Klippel, et al. (2009). "Emerging treatments for multiple myeloma: beyond immunomodulatory drugs and bortezomib." Semin Hematol **46**(2): 166-75.
174. Mitsiades, C. S., D. W. McMillin, S. Klippel, T. Hideshima, D. Chauhan, et al. (2007). "The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1007-34, vii-viii.
175. Mitsiades, C. S., N. Mitsiades, N. C. Munshi and K. C. Anderson (2004). "Focus on multiple myeloma." Cancer Cell **6**(5): 439-44.
176. Mitsiades, C. S., N. S. Mitsiades, C. J. McMullan, V. Poulaki, R. Shringarpure, et al. (2004). "Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors." Cancer Cell **5**(3): 221-30.
177. Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, G. Fanourakis, et al. (2002). "Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14374-9.
178. Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, P. G. Richardson, et al. (2002). "Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications." Blood **99**(12): 4525-30.
179. Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, P. G. Richardson, V. Poulaki, Y. T. Tai, et al. (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications." Blood **101**(6): 2377-80.
180. Molina, J. R. and A. A. Adjei (2006). "The Ras/Raf/MAPK pathway." J Thorac Oncol **1**(1): 7-9.
181. Mollinedo, F. (2007). "Antitumour ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications." Expert Opin Ther Pat **17**(4): 385-405.
182. Mollinedo, F., J. de la Iglesia-Vicente, C. Gajate, A. Estella-Hermoso de Mendoza, J. A. Villa-Pulgarin, et al. (2010). "Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma." Oncogene **29**(26): 3748-57.
183. Morgan, G. J., B. Krishnan, M. Jenner and F. E. Davies (2006). "Advances in oral therapy for multiple myeloma." Lancet Oncol **7**(4): 316-25.
184. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
185. Mukherjee, S., M. Roy, S. Dey and R. K. Bhattacharya (2007). "A Mechanistic Approach for Modulation of Arsenic Toxicity in Human Lymphocytes by Curcumin, an Active Constituent of Medicinal Herb *Curcuma longa* Linn." J Clin Biochem Nutr **41**(1): 32-42.
186. Munker, R. (2007). Modern hematology : biology and clinical management. Totowa, N.J., Humana Press.
187. Naor, D., S. Nedvetzki, I. Golan, L. Melnik and Y. Faitelson (2002). "CD44 in cancer." Crit Rev Clin Lab Sci **39**(6): 527-79.
188. Naumann, U., J. Wischhusen, S. Weit, J. Rieger, H. Wolburg, et al. (2004). "Alkylphosphocholine-induced glioma cell death is BCL-X(L)-sensitive, caspase-independent and characterized by massive cytoplasmic vacuole formation." Cell Death Differ **11**(12): 1326-41.
189. Navran, S. (2008). "The application of low shear modeled microgravity to 3-D cell biology and tissue engineering." Biotechnol Annu Rev **14**: 275-96.

190. Nelson, E. A., S. R. Walker, A. Kepich, L. B. Gashin, T. Hideshima, et al. (2008). "Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting STAT3." *Blood* **112**(13): 5095-102.
191. Nencioni, A., F. Grunebach, F. Patrone, A. Ballestrero and P. Brossart (2007). "Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond." *Leukemia* **21**(1): 30-6.
192. Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." *J Immunol Methods* **139**(2): 271-9.
193. Nieto-Miguel, T., C. Gajate, F. Gonzalez-Camacho and F. Mollinedo (2008). "Proapoptotic role of Hsp90 by its interaction with c-Jun N-terminal kinase in lipid rafts in edelfosine-mediated antileukemic therapy." *Oncogene* **27**(12): 1779-87.
194. Nieto-Miguel, T., C. Gajate and F. Mollinedo (2006). "Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells." *J Biol Chem* **281**(21): 14833-40.
195. Nilsson, K., H. Bennich, S. G. Johansson and J. Ponten (1970). "Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient." *Clin Exp Immunol* **7**(4): 477-89.
196. Oba, Y., J. W. Lee, L. A. Ehrlich, H. Y. Chung, D. F. Jelinek, et al. (2005). "MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells." *Exp Hematol* **33**(3): 272-8.
197. Oberle, C., U. Massing and H. F. Krug (2005). "On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells." *Biol Chem* **386**(3): 237-45.
198. Osathanon, T., K. Bessinyowong, M. Arksornnukit, H. Takahashi and P. Pavasant (2006). "Ti-6Al-7Nb promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells." *J Mater Sci Mater Med* **17**(7): 619-25.
199. Oshima, T., M. Abe, J. Asano, T. Hara, K. Kitazoe, et al. (2005). "Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2." *Blood* **106**(9): 3160-5.
200. Paget, S. (1889). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast." *Lancet* **1**: 571-3.
201. Palacios, C., R. Martin-Perez, A. I. Lopez-Perez, A. Pandiella and A. Lopez-Rivas (2010). "Autophagy inhibition sensitizes multiple myeloma cells to 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin-induced apoptosis." *Leuk Res*.
202. Palumbo, A., A. Bertola, P. Falco, R. Rosato, F. Cavallo, et al. (2004). "Efficacy of low-dose thalidomide and dexamethasone as first salvage regimen in multiple myeloma." *Hematol J* **5**(4): 318-24.
203. Palumbo, A., P. Falco, P. Corradini, A. Falcone, F. Di Raimondo, et al. (2007). "Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network." *J Clin Oncol* **25**(28): 4459-65.
204. Palumbo, A., P. Falco, A. Falcone, G. Benevolo, L. Canepa, et al. (2009). "Melphalan, prednisone, and lenalidomide for newly diagnosed myeloma: kinetics of neutropenia and thrombocytopenia and time-to-event results." *Clin Lymphoma Myeloma* **9**(2): 145-50.
205. Panaretakis, T., K. Pokrovskaja, M. C. Shoshan and D. Grander (2002). "Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin." *J Biol Chem* **277**(46): 44317-26.
206. Park, J., V. Ayyappan, E. K. Bae, C. Lee, B. S. Kim, et al. (2008). "Curcumin in combination with bortezomib synergistically induced apoptosis in human multiple myeloma U266 cells." *Mol Oncol* **2**(4): 317-26.
207. Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." *CA Cancer J Clin* **55**(2): 74-108.
208. Piazza, F. A., C. Gurrieri, L. Trentin and G. Semenzato (2007). "Towards a new age in the treatment of multiple myeloma." *Ann Hematol* **86**(3): 159-72.

209. Plataniias, L. C. (2009). "Biological responses to arsenic compounds." J Biol Chem **284**(28): 18583-7.
210. Ponisch, W., P. S. Mitrou, K. Merkle, M. Herold, M. Assmann, et al. (2006). "Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone--a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO)." J Cancer Res Clin Oncol **132**(4): 205-12.
211. Puthier, D., R. Bataille and M. Amiot (1999). "IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway." Eur J Immunol **29**(12): 3945-50.
212. Puthier, D., S. Derenne, S. Barille, P. Moreau, J. L. Harousseau, et al. (1999). "Mcl-1 and Bcl-xL are co-regulated by IL-6 in human myeloma cells." Br J Haematol **107**(2): 392-5.
213. Quach, H., D. Ritchie, A. K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, et al. (2010). "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma." Leukemia **24**(1): 22-32.
214. Rajkumar, S. V., S. R. Hayman, M. Q. Lacy, A. Dispenzieri, S. M. Geyer, et al. (2005). "Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma." Blood **106**(13): 4050-3.
215. Rajkumar, S. V., S. Jacobus, N. S. Callander, R. Fonseca, D. H. Vesole, et al. (2010). "Lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma: an open-label randomised controlled trial." Lancet Oncol **11**(1): 29-37.
216. Rajkumar, S. V. and A. Palumbo (2007). "Management of newly diagnosed myeloma." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 1141-56, ix-x.
217. Rajkumar, S. V., P. G. Richardson, M. Q. Lacy, A. Dispenzieri, P. R. Greipp, et al. (2007). "Novel therapy with 2-methoxyestradiol for the treatment of relapsed and plateau phase multiple myeloma." Clin Cancer Res **13**(20): 6162-7.
218. Rajkumar, S. V., L. Rosinol, M. Hussein, J. Catalano, W. Jedrzejczak, et al. (2008). "Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for newly diagnosed multiple myeloma." J Clin Oncol **26**(13): 2171-7.
219. Ravindran, J., S. Prasad and B. B. Aggarwal (2009). "Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?" AAPS J **11**(3): 495-510.
220. Rawlings, J. S., K. M. Rosler and D. A. Harrison (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1281-3.
221. Ri, M., S. Iida, T. Nakashima, H. Miyazaki, F. Mori, et al. (2010). "Bortezomib-resistant myeloma cell lines: a role for mutated PSMB5 in preventing the accumulation of unfolded proteins and fatal ER stress." Leukemia **24**(8): 1506-12.
222. Richardson, P. G., E. Blood, C. S. Mitsiades, S. Jagannath, S. R. Zeldenrust, et al. (2006). "A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma." Blood **108**(10): 3458-64.
223. Ringerike, T., F. D. Blystad, F. O. Levy, I. H. Madshus and E. Stang (2002). "Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors are not concentrated in caveolae." J Cell Sci **115**(Pt 6): 1331-40.
224. Robbiani, D. F., K. Colon, S. Ely, M. Chesi and P. L. Bergsagel (2007). "Osteopontin dysregulation and lytic bone lesions in multiple myeloma." Hematol Oncol **25**(1): 16-20.
225. Rokudai, S., N. Fujita, Y. Hashimoto and T. Tsuruo (2000). "Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis." J Cell Physiol **182**(2): 290-6.
226. Rollig, C. and T. Illmer (2009). "The efficacy of arsenic trioxide for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: a systematic review." Cancer Treat Rev **35**(5): 425-30.
227. Rousselot, P., S. Labaume, J. P. Marolleau, J. Larghero, M. H. Noguera, et al. (1999). "Arsenic trioxide and melarsoprol induce apoptosis in plasma cell lines and in plasma cells from myeloma patients." Cancer Res **59**(5): 1041-8.

228. Sakano, K. and S. Kawanishi (2002). "Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes." *Arch Biochem Biophys* **405**(2): 223-30.
229. San-Miguel, J. F. and M. V. Mateos (2009). "How to treat a newly diagnosed young patient with multiple myeloma." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 555-65.
230. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* **17**(6): 1675-87.
231. Seidel, C., A. Sundan, M. Hjorth, I. Turesson, I. M. Dahl, et al. (2000). "Serum syndecan-1: a new independent prognostic marker in multiple myeloma." *Blood* **95**(2): 388-92.
232. Sengul, S., C. Zwizinski and V. Batuman (2003). "Role of MAPK pathways in light chain-induced cytokine production in human proximal tubule cells." *Am J Physiol Renal Physiol* **284**(6): F1245-54.
233. Shinkai, Y., D. Sumi, T. Toyama, T. Kaji and Y. Kumagai (2009). "Role of aquaporin 9 in cellular accumulation of arsenic and its cytotoxicity in primary mouse hepatocytes." *Toxicol Appl Pharmacol* **237**(2): 232-6.
234. Smadja, N. V., C. Bastard, C. Brigaudeau, D. Leroux and C. Fruchart (2001). "Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma." *Blood* **98**(7): 2229-38.
235. Smadja, N. V., C. Fruchart, F. Isnard, C. Louvet, J. L. Dutel, et al. (1998). "Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases." *Leukemia* **12**(6): 960-9.
236. Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
237. Sobottka, S. B., M. R. Berger and H. Eibl (1993). "Structure-activity relationships of four anti-cancer alkylphosphocholine derivatives in vitro and in vivo." *Int J Cancer* **53**(3): 418-25.
238. Song, L., Y. Li, Y. X. Sun, M. Yu and B. F. Shen (2002). "IL-6 inhibits apoptosis of human myeloma cell line XG-7 through activation of JAK/STAT pathway and up-regulation of Mcl-1." *Ai Zheng* **21**(2): 113-6.
239. Stekar, J., P. Hilgard and T. Klenner (1995). "Opposite effect of miltefosine on the antineoplastic activity and haematological toxicity of cyclophosphamide." *Eur J Cancer* **31A**(3): 372-4.
240. Stephanou, A., B. K. Brar, R. A. Knight and D. S. Latchman (2000). "Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters." *Cell Death Differ* **7**(3): 329-30.
241. Stewart, A. K. (2009). "Novel therapies for relapsed myeloma." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 578-86.
242. Sumi, D., Y. Shinkai and Y. Kumagai (2010). "Signal transduction pathways and transcription factors triggered by arsenic trioxide in leukemia cells." *Toxicol Appl Pharmacol* **244**(3): 385-92.
243. Sung, B., A. B. Kunnumakkara, G. Sethi, P. Anand, S. Guha, et al. (2009). "Curcumin circumvents chemoresistance in vitro and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model." *Mol Cancer Ther* **8**(4): 959-70.
244. Sydor, J. R., E. Normant, C. S. Pien, J. R. Porter, J. Ge, et al. (2006). "Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(46): 17408-13.
245. Tai, Y. T., M. Fulciniti, T. Hideshima, W. Song, M. Leiba, et al. (2007). "Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis." *Blood* **110**(5): 1656-63.
246. Thomas, A., T. Trarbach, C. Bartel, D. Laurent, A. Henry, et al. (2007). "A phase IB, open-label dose-escalating study of the oral angiogenesis inhibitor PTK787/ZK 222584 (PTK/ZK), in combination with FOLFOX4 chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer." *Ann Oncol* **18**(4): 782-8.
247. Tian, E., F. Zhan, R. Walker, E. Rasmussen, Y. Ma, et al. (2003). "The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma." *N Engl J Med* **349**(26): 2483-94.
248. Tolcher, A. W., M. Mita, N. J. Meropol, M. von Mehren, A. Patnaik, et al. (2007). "Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal

- antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1." J Clin Oncol **25**(11): 1390-5.
- 249.** Tonon, G. (2007). "Molecular pathogenesis of multiple myeloma." Hematol Oncol Clin North Am **21**(6): 985-1006, vii.
- 250.** Trudel, S., Z. H. Li, J. Rauw, R. E. Tiedemann, X. Y. Wen, et al. (2007). "Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma." Blood **109**(12): 5430-8.
- 251.** Trudel, S., A. K. Stewart, Z. Li, Y. Shu, S. B. Liang, et al. (2007). "The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan." Clin Cancer Res **13**(2 Pt 1): 621-9.
- 252.** Tu, Y., S. Renner, F. Xu, A. Fleishman, J. Taylor, et al. (1998). "BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance." Cancer Res **58**(2): 256-62.
- 253.** Tu, Y., F. H. Xu, J. Liu, R. Vescio, J. Berenson, et al. (1996). "Upregulated expression of BCL-2 in multiple myeloma cells induced by exposure to doxorubicin, etoposide, and hydrogen peroxide." Blood **88**(5): 1805-12.
- 254.** van Blitterswijk, W. J. and M. Verheij (2008). "Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects." Curr Pharm Des **14**(21): 2061-74.
- 255.** Van Ummersen, L., K. Binger, J. Volkman, R. Marnocha, K. Tutsch, et al. (2004). "A phase I trial of perifosine (NSC 639966) on a loading dose/maintenance dose schedule in patients with advanced cancer." Clin Cancer Res **10**(22): 7450-6.
- 256.** Varma, R. and S. Mayor (1998). "GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface." Nature **394**(6695): 798-801.
- 257.** Verstovsek, S., F. Giles, A. Quintas-Cardama, N. Perez, F. Ravandi-Kashani, et al. (2006). "Arsenic derivatives in hematologic malignancies: a role beyond acute promyelocytic leukemia?" Hematol Oncol **24**(4): 181-8.
- 258.** Vink, S. R., J. H. Schellens, W. J. van Blitterswijk and M. Verheij (2005). "Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid." Invest New Drugs **23**(4): 279-86.
- 259.** Vink, S. R., W. J. van Blitterswijk, J. H. Schellens and M. Verheij (2007). "Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy." Cancer Treat Rev **33**(2): 191-202.
- 260.** Voorhees, P. M., Q. Chen, D. J. Kuhn, G. W. Small, S. A. Hunsucker, et al. (2007). "Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma." Clin Cancer Res **13**(21): 6469-78.
- 261.** Voorhees, P. M., Q. Chen, G. W. Small, D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, et al. (2009). "Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death." Br J Haematol **145**(4): 481-90.
- 262.** Wakelee, H. A., A. Patnaik, B. I. Sikic, M. Mita, N. L. Fox, et al. (2010). "Phase I and pharmacokinetic study of lexatumumab (HGS-ETR2) given every 2 weeks in patients with advanced solid tumors." Ann Oncol **21**(2): 376-81.
- 263.** Wan, C. K., C. Wang, H. Y. Cheung, M. Yang and W. F. Fong (2006). "Triptolide induces Bcl-2 cleavage and mitochondria dependent apoptosis in p53-deficient HL-60 cells." Cancer Lett **241**(1): 31-41.
- 264.** Wang, Z. Y. and Z. Chen (2008). "Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable." Blood **111**(5): 2505-15.
- 265.** Ward, P. D., H. Ouyang and D. R. Thakker (2003). "Role of phospholipase C-beta in the modulation of epithelial tight junction permeability." J Pharmacol Exp Ther **304**(2): 689-98.
- 266.** Webb, J. L. (1963). Enzyme and metabolic inhibitors. New York, Academic Press.
- 267.** Wen, J., Y. Feng, W. Huang, H. Chen, B. Liao, et al. (2010). "Enhanced antimyeloma cytotoxicity by the combination of arsenic trioxide and bortezomib is further potentiated by p38 MAPK inhibition." Leuk Res **34**(1): 85-92.

268. Xiao, H., Q. Xiao, K. Zhang, X. Zuo and U. K. Shrestha (2010). "Reversal of multidrug resistance by curcumin through FA/BRCA pathway in multiple myeloma cell line MOLP-2/R." Ann Hematol **89**(4): 399-404.
269. Yaccoby, S., M. J. Wezeman, M. Zangari, R. Walker, M. Cottler-Fox, et al. (2006). "Inhibitory effects of osteoblasts and increased bone formation on myeloma in novel culture systems and a myelomatous mouse model." Haematologica **91**(2): 192-9.
270. Yasui, H., T. Hideshima, H. Ikeda, J. Jin, E. M. Ocio, et al. (2007). "BIRB 796 enhances cytotoxicity triggered by bortezomib, heat shock protein (Hsp) 90 inhibitor, and dexamethasone via inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase/Hsp27 pathway in multiple myeloma cell lines and inhibits paracrine tumour growth." Br J Haematol **136**(3): 414-23.
271. Yeh, H. S. and J. R. Berenson (2006). "Treatment for myeloma bone disease." Clin Cancer Res **12**(20 Pt 2): 6279s-6284s.
272. Yoshida, K., Y. Miki and D. Kufe (2002). "Activation of SAPK/JNK signaling by protein kinase Cdelta in response to DNA damage." J Biol Chem **277**(50): 48372-8.
273. Zhou, L., J. Hou, W. Fu, D. Wang, Z. Yuan, et al. (2008). "Arsenic trioxide and 2-methoxyestradiol reduce beta-catenin accumulation after proteasome inhibition and enhance the sensitivity of myeloma cells to Bortezomib." Leuk Res **32**(11): 1674-83.
274. Zhou, Y., B. Barlogie and J. D. Shaughnessy, Jr. (2009). "The molecular characterization and clinical management of multiple myeloma in the post-genome era." Leukemia **23**(11): 1941-56.

VIII. Приложение I

1. Апаратура и консумативи, използвани при работа с клетъчни култури

1.1. Основна апаратура и консумативи

- Ламинарен бокс с вертикален въздушен поток за асептична работа LaminAir HV 2436 (Heraeus, Германия)
- Ламинарен бокс с второ ниво на биологична безопасност Baker SterilGARD (Baker, САЩ)
 - Инкубатор за клетъчно култивиране ВВ16 (Heraeus)
 - Фризери за дълбоко замразяване на клетки – -80°C и -150°C (Sanyo, Япония)
 - Обикновени фризери (-20°C) и хладилници ($+4^{\circ}\text{C}$)
 - Фазово-контрастен инвертен микроскоп TMS (Nikon, Япония)
 - Центрофуга Z200A с ротор 220.97 за епруветки от 15 и 50 ml (Hermle, Германия)
 - Охлаждаща центрофуга Universal 32 R с ротор 1617 за епруветки от 15 и 50 ml (Hettich, Германия)
 - Центрофуги Minispin (с ротор F-45-12-11) и 5417 R (с ротор FA-45-24-11) за епруветки от 0,5, 1,5 и 2,0 ml (Eppendorf, Германия)
 - Автоклав
 - Водна баня
 - Вакуумна помпа Vacusafe (IBS Integra Bioscience, Германия)
 - Хемоцитометрична камера тип Neubauer (Zeiss, Германия)
 - Стерилни матраци за култивиране на клетки – 25 и 75 cm² (TPP, Швейцария)
 - Стерилни 6-, 12-, 24- и 96-ямкови плаки за клетъчно култивиране (Greiner bio-one, Германия)
 - Стъклени пипети – 1, 2, 5, 10, 20 и 50 ml
 - Регулируеми пипети, работещи с пластмасови връхчета с различна вместимост (0,01, 0,2, 1 и 5 ml) (различни производители)
 - Пластмасови връхчета с различна вместимост (0,01, 0,2, 1 и 5 ml) (различни производители)

- Стерилни епруветки – 15 и 50 ml (Greiner bio-one)
- Стерилни спринцовки и игли (различни производители)
- Криоепруветки – 2 ml (Greiner bio-one)
- Стерилни филтри, Luer Lock, 0,2 μm (Millipore, САЩ)
- Синтетична течна хранителна среда RPMI-1640 (Invitrogen, САЩ; кат. № 21870-076)
- Фетален телешки серум (FBS) (Sigma-Aldrich, САЩ; кат. № F7524)
- Разтвор на L-глутамин с концентрация 200 mM (Sigma-Aldrich; кат. № 59202C)
- 2,5%-ен трипсинов разтвор (Invitrogen; кат. № 15090-046)
- MethoCult® GF H4434 (STEMCELL Technologies, Канада; кат. № 04434) – специална хранителна среда за отглеждане на хемопоеични клетки
- Стерилен и изотоничен фосфатен буфер с рН 7,4
- Диметилсулфоксид (Merck, Германия; кат. № 317275)
- 70%-ен разтвор на етанол за дезинфекция
- 0,4%-ен разтвор на трипаново синьо (Sigma-Aldrich; кат. № T8154)

1.2. За изолиране на моноклеарни клетки от кръв или костен мозък

- Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Великобритания; кат. № 17-1440-02) - разтвор за отделяне на моноклеарни клетки от кръв чрез градиентно центрофугиране. В 1 литър разтвор се съдържат 57 g Ficoll 400 (синтетичен полимер от захароза и епихлорхидрин), 90 g натриев диатризоат и 0,231 g $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$.

1.3. За пространствено разделяне на миеломни клетки U-266 и остеобластни SAOS-2 при съвместното им култивиране в обща среда

- Стерилни поликарбонатни филтри Millicell®-PCF с диаметър на порите 0,4 μm (Millipore; кат. № P1HP01250)

1.4. За триизмерно клетъчно култивиране

- Ротационна биореакторна система RCCS-D (Synthecon, САЩ):



Фиг. VIII.1. Биореакторна система RCCS-D. Състои се от контролен модул и задвижващо устройство, върху което се монтира стерилен модул за еднократна употреба.

2. Апаратура и вещества, използвани при изследване на физиологични параметри на клетките

2.1. За оценка на виталността на клетките по МТТ-метода на Mosmann

- МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиев бромид) (GERBU Biochemicals, Германия; кат. № 1006). Беше приготвян разтвор с концентрация 10 mg/ml в стерилен фосфатен буфер (PBS). Разтворът се съхранява на тъмно при 4°C до един месец.
- 5%-ен разтвор на мравчена киселина в изопропилов алкохол
- Спектрофотометър Anthos 2001 (Anthos Labtec Instruments, Австрия)

2.2. За оценка на миграционната активност на клетките

- Безсерумна хранителна среда OPTI-MEM® I (Invitrogen; кат. № 22600)
- Стерилни поликарбонатни филтри Millicell®-PCF с диаметър на порите 8 µm (Millipore; кат. № PI8P01250)
- Багрило CellTiter Blue® за оценка на броя на мигриралите клетки (Promega Corporation, САЩ; кат. № G8081)
- Флуорометър Synergy 2 (BioTek, САЩ)

2.3. За оценка на адхезионната способност на клетките

- Говежди серумен албумин (GERBU Biochemicals; кат. № 1064)
- Фибронектин, добит от човешка плазма (Sigma-Aldrich; кат. № F0895)
- Рекомбинантен човешки остеопонтин (EMР Genetech) и остеопонтин, добит от майчино мляко
- 50%-ен разтвор на глутаралдеhid (Sigma-Aldrich; кат. № 340855)
- Кристалвиолет (Sigma-Aldrich; кат. № C3886). Беше използван под форма на 0,1%-ен буфериран разтвор (200 mM MES, pH 6,0).
- 10%-ен разтвор на оцетна киселина
- Спектрофотометър Anthos 2001 (Anthos Labtec Instruments, Австрия)

3. Апаратура и вещества, използвани при изготвяне и анализ на микроскопски препарати

- Центрофуга за “цитоспин” (Shandon, Великобритания)
- Предметни стъкла
- 1%-ен разтвор на формалдеhid
- DAPI (4',6-диамидин-2'-фенилиндол дихидрохлорид) (Roche Applied Science, Германия; кат. № 10 236 276 001) – флуоресцентно багрило, свързващо се специфично с ДНК. Беше приготвен разтвор с концентрация 1 µg/ml и беше съхраняван при –20°C.
- Субединица В на холератоксина, конюгирана с флуоресцеинизотиоцианат (СТхВ-FITC) (Sigma-Aldrich; кат. № C1655) – за визуализиране на ганглиозид GM1-съдържащите мембранни липидни рафтове. Съхранява се при +4°C. Беше използван под форма на разтвор с концентрация 10 µg/ml.
- Флуоресцентен микроскоп Axioplan (Zeiss, Германия)

4. Апаратура и консумативи, използвани при имуноблот

4.1. За лизиране на пробите

- Суспензионен буфер със състав:

- 100 mM NaCl;
- 10 mM Трис.НCl;
- 1 mM EDTA;
- двойно дестилирана вода.

За 100 ml:	
NaCl	0,584 g
Трис.НCl	0,1576 g
EDTA	0,03722 g
dd H ₂ O	до 100 ml

Непосредствено преди употреба се прибавят протеиназни инхибитори:

▪ Смес от протеиназни инхибитори Complete (Roche Applied Science; кат. № 1697498) – 25× разтвор, съхраняван при –20°C. Разтворът беше приготвян съгласно инструкциите на производителя, чрез разтваряне на една таблетка Complete в 2 ml дестилирана вода.

▪ NaVO₃ (натриев метаванадат) – 100× разтвор (0,1 M), съхраняван при –80°C. Крайна концентрация в суспензионния буфер: 1 mM.

➤ Лизиращ буфер със състав:

- 100 mM Трис.НCl;
- 4% SDS (натриев додецилсулфат);
- 20% глицерол;
- двойно дестилирана вода.

За 80 ml:	
1 M Трис.НCl, pH 6.8	10 ml
10% SDS	40 ml
глицерол	20 ml
dd H ₂ O	до 80 ml

Непосредствено преди употреба се прибавят протеиназни инхибитори:

▪ DTT – 5× разтвор (1 M), съхраняван при –20°C. Крайна концентрация в лизирация буфер: 200 mM.

▪ Смес от протеиназни инхибитори Complete (Roche Applied Science; кат. № 1697498) – 25× разтвор, съхраняван при –20°C. Разтворът беше приготвян съгласно инструкциите на производителя, чрез разтваряне на една таблетка Complete в 2 ml дестилирана вода.

▪ NaVO₃ (натриев метаванадат) – 100× разтвор (0,1 M), съхраняван при –80°C. Крайна концентрация в суспензионния буфер: 1 mM.

➤ Водна баня

➤ Клатачна машина с термостат Thermomixer Comfort (Eppendorf)

4.2. За концентриране на кондиционирани среди и специфично разцепване на наличния в тях остеопонтин

➤ Епруветки за концентриране на протеини Amicon Ultra-15, чиито мембрани задържат протеини с молекулна маса над 10 000 (Millipore; кат. № UFC901008)

- Охлаждаща центрофуга Universal 32 R за епруветки от 15 и 50 ml (Hettich)
- Тромбин, добит от човешка плазма (Fluka; кат. № 89223). Беше приготвен тромбинов разтвор с концентрация 0,13 U/μl в буфер със следния състав:

- 50 mM натриев цитрат, pH 6,5;
- 200 mM NaCl;
- 0,1% PEG 8000;
- 50% глицерин;
- двойно дестилирана вода.

Разтворът беше порциониран и беше съхраняван при -20°C .

- Буфер с оптимален състав за ензимното действие на тромбина:
 - 50 mM Трис, pH 8,0;
 - 150 mM NaCl;
 - 2,5 mM CaCl_2 ;
 - 0,1% 2-меркаптоетанол;
 - двойно дестилирана вода.

4.3. За определяне на белтъчната концентрация

➤ Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, САЩ; кат. № 23227) – комплект за определяне на белтъчната концентрация. Комплектът включва следното

- Реагент А – 500 ml разтвор на динатриев карбонат, натриев хидрогенкарбонат, бицинхонинова киселина (BCA) и натриев тартрат в 0,2 N NaOH;

- Реагент В – 25 ml 4%-ен разтвор на меден сулфат;

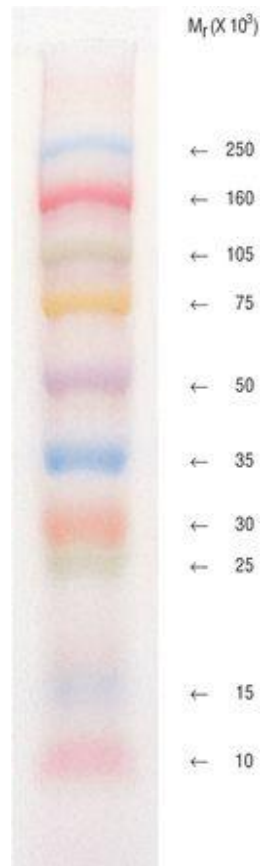
- 10 ампули по 1 ml разтвор на пречистен говежди серумен албумин (BSA) с концентрация 2 mg/ml в 0,9% NaCl и 0,05% натриев азид.

➤ Roti®-Nanoquant (Carl Roth GmbH, Германия; кат. № K880.2) – реактив за определяне на белтъчната концентрация

- 96-ямкови плаки
- Двойно дестилирана вода
- Инкубатор при 37°C
- Изоамилов алкохол
- Спектрофотометър Anthos 2001 (Anthos Labtec Instruments, Австрия)

4.4. За определяне на молекулната маса на протеините

➤ Протеинов маркер Full Range Rainbow™ (GE Healthcare; кат. № RPN800). Представява смес от различно оцветени белтъци с известни молекулни маси, разтворени в буфер, съдържащ MESNA като редуциращ агент и 35% глицерол. Концентрацията на всеки протеин е 150 µg/ml. Условия на съхранение: -20°C. При електрофореза се разделя на 10 фракции (фиг. VIII.2.).



Фиг. VIII.2. Електрофоретично разделяне и молекулни маси на отделните протеини в маркера Full Range Rainbow™.

4.5. За провеждане на електрофореза в полиакриламиден гел

- Електрофорезна камера XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)
- Градиентни (4-12%) полиакриламидни гелове NuPAGE® Novex Bis-Tris (Invitrogen; кат. № NP0322BOX)
- Трансформатор
- 20× електрофорезен буфер със състав:

- 1 M MOPS;
- 1 M Трис;
- 2% SDS;
- 20 mM EDTA;
- двойно дестилирана вода.

За 500 ml:	
MOPS	104,6 g
Трис	60,6 g
SDS	10,0 g
EDTA	3,0 g
dd H ₂ O	до 500 ml

Съхранява се на тъмно при 4°C. Разтворът е стабилен в продължение на 6 месеца. Преди употреба се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:19. рН на работния разтвор е 7,7.

➤ 20× електрофорезен буфер със състав:

- 1 M MES;
- 1 M Трис;
- 2% SDS;
- 20 mM EDTA;
- двойно дестилирана вода.

За 500 ml:	
MES	97,6 g
Трис	60,6 g
SDS	10,0 g
EDTA	3,0 g
dd H ₂ O	до 500 ml

Съхранява се на тъмно при 4°C. Разтворът е стабилен в продължение на 6 месеца. Преди употреба се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:19. рН на работния разтвор е 7,3.

➤ Буфер за нанасяне на проби NuPAGE® LDS 4X (Invitrogen; кат. № NP0008)

4.6. За напречния електротрансфер

- Апарат за електротрансфер по “полусух” метод
- Трансформатор
- PVDF-мембрана (Roche Applied Science; кат. № 03010040001)
- Филтърна хартия Whatman
- Трансферен буфер, който беше приготвян по следната рецепта:
 - Трис 3 g
 - Глицин 14,4 g
 - Двойно дестилирана вода до 500 ml
 - Метанол 200 ml
 - Двойно дестилирана вода до 1000 ml

Съхранява се на тъмно при 4°C.

4.7. За имунологичната обработка на мембраните:

- Клатачна машина
- 10× буфер (TBS), който беше приготвян по следната рецепта:
 - Трис 24,2 g
 - NaCl 80 g
 - Двойно дестилирана вода до 500 ml
 - 37%-ен разтвор на HCl до pH 7,6
 - Двойно дестилирана вода до 1000 ml

Преди употреба се разрежда с дестилирана вода в съотношение 1:9.

- Блокиращ разтвор със състав:
 - Обезмаслено мляко на прах 25 g
 - Tween 20 0,5 ml
 - 1× TBS, pH 7,6 500 ml
- Маркиращ разтвор със състав:
 - Обезмаслено мляко на прах 2,5 g
 - Tween 20 0,5 ml
 - 1× TBS, pH 7,6 500 ml
- Първични антитела
 - Actin (C-11) – козе IgG поликлонално антитяло срещу човешки β-актин, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, САЩ; кат. № sc-1615; парт. № I2608)
 - Bcl-2 (100) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки Bcl-2, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-509; парт. № L2807)
 - Bcl-XL (H-5) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки Bcl-X_L, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-8392; парт. № I0407)
 - Mcl-1 (22) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки Mcl-1_{L/S}; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-12756)
 - Rb (IF8) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки Rb, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-102; парт. № G1305)
 - p53 (DO-1) – мише IgG_{2a} моноклонално антитяло срещу p53, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-126 ; парт. № D2908)
 - NF-κB p65 (C-20) – заешко IgG поликлонално антитяло срещу човешки NF-κB p65, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-372; парт. № K1505)

- Akt1/2/3 (H-136) – заешко IgG поликлонално антитяло срещу човешки Akt1/2/3; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-8312)
- p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R – заешко IgG поликлонално антитяло срещу човешки Akt1, Akt2 и Akt3, фосфорилирани съответно при Ser473, Ser474 или Ser472; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-7985-R; парт. № A1807)
- ERK1 (K-23) – заешко IgG поликлонално антитяло срещу човешки ERK1/2; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-94; парт. № F262)
- ERK2 (D-2) – мише IgG_{2b} моноклонално антитяло срещу човешки ERK2, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-1647; парт. № L2908)
- p-ERK (E-4) – мише IgG_{2a} моноклонално антитяло срещу човешки ERK1/2, фосфорилиран при Tyr204; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-7383; парт. № G182)
- Caspase-8 p18 (C-20) – козе IgG поликлонално антитяло срещу човешка прокаспаза-8 и субединица p18 на активна каспаза-8; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-6136; парт. № G3106)
- Caspase-9 p10 (F-7) – мише IgG_{2a} моноклонално антитяло срещу човешка прокаспаза-9; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-17784; парт. № F2206)
- Cleaved Caspase-9 (Asp330) – заешко поликлонално антитяло срещу активна човешка каспаза-9 (Cell Signaling Technology, САЩ; кат. № 9501)
- Caspase-3 (31A1067) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешка прокаспаза-3 и активните и фрагменти; 100 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-56053; парт. № L0506)
- Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) – заешко моноклонално антитяло срещу активна човешка каспаза-3 (Cell Signaling Technology; кат. № 9664)
- PARP-1 (F-2) – мише IgG_{2a} моноклонално антитяло срещу човешки PARP-1; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-8007; парт. № H1506)
- PARP – заешко поликлонално антитяло срещу човешки PARP (Cell Signaling Technology; кат. № 9542)
- JNK (D-2) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки JNK1/2/3; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-7345)
- p-JNK (G-7) – мише IgG₁ моноклонално антитяло срещу човешки JNK1/2/3, фосфорилиран при Thr183 и Tyr185; 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-6254)

- Phospho-c-Raf (Ser338) (56A6) – заешко моноклонално антитяло срещу човешки c-Raf, фосфорилиран при Ser338 (Cell Signaling Technology; кат. № 9427)
 - Phospho-MEK1/2 (Ser217/221) (41G9) – заешко моноклонално антитяло срещу човешки MEK1/2, фосфорилиран при Ser217 и Ser221 (Cell Signaling Technology; кат. № 9154)
 - Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP™ – заешко моноклонално антитяло срещу човешки ERK1 (p42 MAPK) и ERK2 (p44 MAPK), фосфорилирани при Thr202 и Tyr204 (ERK1) или при Thr185 и Tyr187 (ERK2) (Cell Signaling Technology; кат. № 4370)
 - Phospho-p90RSK (Ser380) (9D9) – заешко моноклонално антитяло срещу човешки p90RSK, фосфорилиран при Ser380 (Cell Signaling Technology; кат. № 9335)
 - Phospho-MSK1 (Thr581) – заешко поликлонално антитяло срещу човешки MSK1, фосфорилиран при Thr581 (Cell Signaling Technology; кат. № 9595)
 - Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP™ – заешко моноклонално антитяло срещу човешки STAT3 α/β , фосфорилиран при Tyr705 (Cell Signaling Technology; кат. № 9145)
 - FAS (C-20) – заешко IgG поликлонално антитяло срещу човешки FAS/CD95; 200 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-715; парт. № K2006)
 - LC3B – заешко поликлонално антитяло срещу човешки LC3B-I/II (Cell Signaling Technology; кат. № 2775)
 - AQP9 (G-3) – мише IgG_{2a} моноклонално антитяло срещу човешки аквапорин-9; 200 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-74409)
 - Osteopontin – заешко поликлонално антитяло срещу човешки остеопонтин; 80 mg/ml (Abcam, Великобритания; кат. № ab8448)
 - Transferrin (I-20) – козе IgG поликлонално антитяло срещу миши трансферин; 200 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-22597; парт. № F0106)
- Миеш разтвор със състав:
- Tween 20 1 ml
 - 1 \times TBS, pH 7,6 до 1000 ml
- Вторични антитела
- Donkey anti-goat IgG-HRP – магарешко антикозе IgG антитяло, конюгирано с пероксидаза от хрян; 400 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-2020; парт. № C1308)

- Goat anti-mouse IgG-HRP – козе антимише IgG антитяло, конюгирано с пероксидаза от хрян; 400 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-2055; парт. № K2607)
 - Goat anti-rabbit IgG-HRP – козе антизаешко IgG антитяло, конюгирано с пероксидаза от хрян; 400 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-2054)
 - Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody – козе антизаешко IgG антитяло, конюгирано с пероксидаза от хрян (Cell Signaling Technology; кат. № 7074)
- Субединица В на холератоксина, конюгирана с пероксидаза от хрян (СТхВ-HRP) (Sigma-Aldrich; кат. № C3741) – за детекция на ганглиозид GM1. Съхранява се при +4°C. Преди употреба реактивът беше разтворен в 100 µl вода.

4.8. За визуализиране на комплексите антиген-антитяло

- Хемилуминесцентен реактив Western Lightning™ (PerkinElmer, САЩ; кат. № NEL101001EA). Реактивът се приготвя непосредствено преди употреба чрез смесването на равни обеми от два разтвора: разтвор I и разтвор II. Разтвор I съдържа луминол, а разтвор II – водороден пероксид.
- Рентгенови касети
 - Фотографски плаки Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare; кат. № 28-9068-36)
 - Машина и разтвори за проявяване (AGFA, Белгия)

4.9. За отстраняване на антителата от мембраните (стрипиране)

- Разтвор за стрипиране със състав:

- 62,5 mM Трис.НCl, pH 6,8;
- 2% SDS;
- 0,7% 2-меркаптоетанол*;
- двойно дестилирана вода.

За 500 ml:	
Трис.НCl	4,9 g
SDS	10,0 g
2-меркаптоетанол*	3,5 ml
dd H ₂ O	до 500 ml

* 2-меркаптоетанолът се прибавя непосредствено преди употреба.

- Клатачна машина с термостат

5. Апаратура и вещества, използвани при изследване на клетъчното ДНК-съдържание по поточно-цитометричния метод на Nicoletti

- Поточен цитометър FACSCalibur (Becton Dickinson, САЩ)
- Разтвор със състав:
 - 50 µg/ml пропидиев йодид;
 - 0,1% Triton® X-100;
 - 0,1% натриев цитрат.

6. Апаратура и консумативи, използвани за установяване на олигонуклеозомна ДНК-фрагментация

6.1. За изолиране на ДНК от цитозола на клетките

- Лизиращ буфер със състав:
 - 150 mM NaCl;
 - 1 mM K₂HPO₄;
 - 5 mM MgCl₂;
 - 1 mM EGTA (етиленгликол-бис(2-аминоетилетер)-N,N,N',N'-тетраоцетна киселина);
 - 5 mM HEPES (4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонова киселина);
 - 10% глицерол;
 - 1 mM NaVO₃;
 - 0,3% Triton® X-100.
- pH на буфера трябва да е 7,4.
- 6 M NaCl
 - Изопропилов алкохол
 - 70%-ен етанол
 - Двойно дестилирана вода

6.2. За изолиране на ДНК от ядра на миеломни клетки, които са били инкубирани с цитозол от клетки SKW-3

- Материалите изброени в предходната точка (6.1.)
- Буфер със същия състав и рН като горния, но без Triton® X-100
- QIAamp DNA Blood mini (QIAGEN, Германия; кат. № 51104) – комплект за изолиране на ДНК от кръв. Комплектът съдържа:
 - колонки QIAamp Mini Spin;
 - буфер AL;
 - буфер AW1 (концентрат);
 - буфер AW2 (концентрат);
 - буфер AE;
 - протеаза QIAGEN® и разтворител за нея;
 - събирателни епруветки.
- Центрофуга (Eppendorf)
- Апарат за разбиване на разтвори („вортексиране“) REAXtop (Heidolph, Германия)
- 100%-ен етанол
- Вода, несъдържаща нуклеази
- Спектрофотометър GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare)

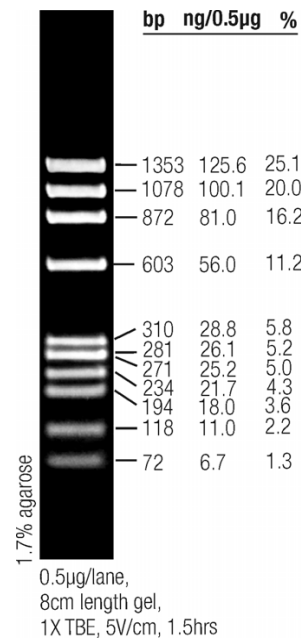
6.3. За провеждане на ДНК-електрофореза в агарозен гел

- Камера за хоризонтална гел-електрофореза
- Трансформатор
- Агароза (Sigma-Aldrich; кат. № A9539)
- 50× TAE-буфер, приготвян по следната рецепта:

242 g Трис се разтварят в 500 ml дестилирана вода. Добавят се 100 ml 0,5 M Na₂EDTA (рН 8,0) и 57,1 ml ледена оцетна киселина. Долива се дестилирана вода до краен обем 1 l. Съхранява се при стайна температура. Преди употреба се разрежда 50 пъти.

- ФХ174 DNA/BSuRI (HaeIII) Marker, 9 (Fermentas, Канада; кат. № SM0253) – маркер за определяне на дължината на ДНК-молекулите. Маркерът съдържа фрагменти от ДНК на бактериофаг ФХ174, получени под действие на рестриктазата BSuRI.

Концентрацията на ДНК-фрагментите е 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ в 10 mM Tris.HCl (pH 7,6) и 1 mM EDTA. Условия на съхранение: -20°C . При електрофореза се разделя на 11 фракции (фиг. VIII.3.)



Фиг. VIII.3. Електрофоретично разделяне и дължина на отделните ДНК-фрагменти в маркера ФХ174 DNA/BSuRI (HaeIII).

➤ 6 \times оцветяващ разтвор за нанасяне на пробите върху гела (Fermentas; кат. № R0611). Състав: 10 mM трис.HCl (pH 7,6), 0,03% бромфенолово синьо, 0,03% ксилен цианол FF, 60% глицерол и 60 mM EDTA.

- Разтвор на етидиев бромид с концентрация 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- UV-трансилуминатор Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, САЩ)

7. Апаратура и консумативи, използвани за изолиране на лизатни фракции, съдържащи мембранни липидни рафтове

- TNEV-буфер със състав:
 - 10 mM Трис.HCl;
 - 150 mM NaCl;
 - 5 mM EDTA;
 - 1 mM NaVO_3 ;
 - 1 \times смес от протеиназни инхибитори Complete;
 - 1mM PMSF (фенилметилсулфонилфлуорид).

pH на буфера трябва да е 7,5. Съхранява се при -20°C .

➤ Лизиращ буфер, който се приготвя като към TNEV-буфер се прибави Triton® X-100 до крайна концентрация 1%

- Разтвори на захароза в TNEV-буфер – 85%, 35% и 5%
- Хомогенизатори тип Potter-Elvehjem
- Ултрацентрифуга Optima™ LE-80K (Beckman Coulter, САЩ)
- Ротор SW 40 Ti (Beckman Coulter, САЩ)
- Ултрацентрифужни епруветки (Beckman Coulter; кат. № 331374)

8. Апаратура и консумативи, използвани при анализ на вътреклетъчното натрупване на арсен

- 25%-ен разтвор на тетраметиламониев хидроксид (Fluka; кат. № 87729)
- Атомно-абсорбционен спектрометър (PerkinElmer, САЩ)

9. Апаратура и консумативи, използвани при RT-PCR

9.1. За изолиране на тотална РНК и измерване на концентрацията ѝ

- Комплект RNeasy Mini Kit (QIAGEN; кат. № 74106). Комплектът съдържа:
 - колонки RNeasy;
 - буфер RLT;
 - буфер RW1;
 - буфер RPE (концентрат);
 - събирателни епруветки.
- 2-меркаптоетанол
- Етанол
- Вода, несъдържаща РНКазы
- Центрофуга (Eppendorf)
- Апарат за разбиване на разтвори („вортексиране“) REAXtop (Heidolph)
- Спектрофотометър GeneQuant pro RNA/DNA Calculator (GE Healthcare)

9.2. За пречистване на изолираната РНК от замърсяваща я ДНК

- TURBO DNA-free™ Kit (Ambion, САЩ; кат. № AM1907). Комплектът съдържа:
 - дезоксирибонуклеаза TURBO DNase (2U/μl);
 - концентриран реакционен буфер (10x);
 - реактив за инактивиране на дезоксирибонуклеазата;
 - вода, несъдържаща нуклеази.

Целият комплект се съхранява при –20°C.

9.3. За обратна транскрипция на иРНК до кДНК

- Комплект Omniscript™ RT Kit (QIAGEN; кат. № 205111). Комплектът съдържа:
 - обратна транскриптаза Omniscript;
 - буфер RT, 10x;
 - смес от дезоксинуклеотидтрифосфати (5 mM за всеки дНТФ);
 - вода, несъдържаща РНКази.

Целият комплект се съхранява при –20°C.

➤ Олиго(дТ)₁₈-праймер (100 μM) (Fermentas; кат. № SO132). Съхранява се при –20°C.

➤ RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas; кат. № EO0381) – инхибитор на РНКазите. Концентрация: 40U/μl. Съхранява се при –20°C.

- UV-бокс за работа с нуклеинови киселини
- Центрофуга (Eppendorf)
- Термоциклер Mastercycler Gradient (Eppendorf)

9.4. За амплификация на ДНК чрез PCR

- Бяха използвани следните чифтове праймери:

• Чифт праймери, осигуряващи амплифицирането на участък от кДНК за синтез на интерлевкин-6:

– 5`-праймер: 5` – АГЦ ЦАГ АГЦ ТГТ ГЦА ГАТ Г – 3`

– 3`-праймер: 5` – ЦТГ ЦАГ ЦЦА ЦТГ ГТТ ЦТГ Т – 3`

Ампликонът е с дължина 145 nt. Праймерите бяха закупени от Invitrogen, Германия.

• Чифт праймери, осигуряващи амплифицирането на участък от кДНК за синтез на остеопонтин:

- 5`-праймер: 5` – ЦГЦ АГА ЦЦТ ГАЦ АТЦ ЦАГ Т – 3`
- 3`-праймер: 5` – ГГЦ ТГТ ЦЦЦ ААТ ЦАГ ААГ Г – 3`

Ампликонът е с дължина 136 nt и е един и същ, независимо от това кой от трите известни транскрипта на гена за остеопонтин е послужил за субстрат. Праймерите бяха закупени от групата за синтез на олигонуклеотиди към Германския център за онкологични изследвания (DKFZ – Deutsches Krebsforschungszentrum) в Хайделберг.

• Чифт праймери, осигуряващи амплифицирането на участъци от кДНК за синтез на остеопонтин:

- 5`-праймер: 5` – ТАЦ ЦАГ ТТА ААЦ АГГ ЦТГ АТТ Ц – 3`
- 3`-праймер: 5` – ЦЦА ТАТ ЦАТ ЦЦА ТГТ ГГТ ЦА – 3`

Ампликоните са различни по дължина, в зависимост от това кой от трите известни транскрипта на гена за остеопонтин е послужил за субстрат. Дължината на ампликоните е съответно 216 nt за OPN-a, 174 nt за OPN-b и 135 nt за OPN-c. Праймерите бяха закупени от Invitrogen, Германия.

• Чифт праймери, осигуряващи амплифицирането на участък от кДНК за синтез на Bcl-XL:

- 5`-праймер: 5` – АГЦ ЦТТ ГГА ТЦЦ АГГ АГА А – 3`
- 3`-праймер: 5` – ГЦТ ГЦА ТТГ ТТЦ ЦЦА ТАГ АГТ – 3`

Ампликонът е с дължина 64 nt. Праймерите бяха закупени от Invitrogen, Германия.

• Чифт праймери, осигуряващи амплифицирането на участък от кДНК за синтез на GAPDH (глицералдехид-3-фосфат-дехидрогеназа):

- 5`-праймер: 5` – АГЦ ЦАЦ АТЦ ГЦТ ЦАГ АЦА Ц – 3`
- 3`-праймер: 5` – ГЦЦ ЦАА ТАЦ ГАЦ ЦАА АТЦ Ц – 3`

Ампликонът е с дължина 66 nt. Праймерите бяха закупени от Invitrogen, Германия.

➤ REDTaq DNA Polymerase (Genaxxon BioScience GmbH, Германия; кат. № M3305.2500) – рекомбинантна Таq-ДНК-полимераза смесена с инертно червено багрило. Концентрация: 1 U/μl. Съхранява се при –20°C.

➤ 10× PCR Buffer S (Genaxxon BioScience GmbH; кат. № M3453.0015) – буфер за провеждане на PCR-реакция. Състав: 100 mM Трис.HCl (pH 9,0), 500 mM KCl, 1% Triton® X-100.

➤ Разтвор на MgCl₂ (25 mM) (Genaxxon BioScience GmbH; кат. № M3453.0015)

➤ Смес от дезоксинуклеотидтрифосфати (10 mM за всеки дНТФ) (Fermentas; кат. № R0192). Съхранява се при –20°C.

➤ Вода, несъдържаща нуклеази

- UV-бокс за работа с нуклеинови киселини
- Центрофуга (Eppendorf)
- Термоциклер Mastercycler Gradient (Eppendorf)

9.5. За електрофоретичен анализ на продуктите от RT-PCR

- Апарат за капилярна гел-електрофореза QIAxcel (QIAGEN, Германия)
- Патрони с азот под налягане QX Nitrogen Cylinder (QIAGEN; кат. № 929705)
- Комплект QIAxcel DNA Screening Kit (QIAGEN; кат. № 929004). Комплектът съдържа:
 - QIAxcel DNA Screening Cartridge – касета за електрофоретично разделяне на ДНК-фрагменти с дължина между 15 и 5 000 bp;
 - разделителен буфер;
 - миеш буфер;
 - минерално масло;
 - маркер за калибриране на интензитета на сигналите от отделните капиляри;
 - епруветки.
- QX Alignment Marker 15 bp/1 kb (QIAGEN; кат. № 929521) – маркер, служещ за синхронизиране на сигналите, получени от отделните капиляри. Условия на съхранение: –20°C.
- QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII (QIAGEN; кат. № 929550) – маркер за определяне на дължината на ДНК-молекулите. Маркерът съдържа ДНК-фрагменти от разграждането на плаزمида pUC18 под действие на рестриктазата HaeIII. Отделните фрагменти имат следните дължини: 80, 102, 174, 257, 267, 298, 434, 458 и 587 bp. Общата концентрация на ДНК-фрагментите е 100 ng/μl. Условия на съхранение: –20°C.

10. Апаратура и консумативи, използвани при провеждане на трансфекционни експерименти

10.1. Реагенти, подпомагащи процеса на трансфекция

- Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen; кат. № 11668-019) – трансфектиращ реагент, представляващ разтвор на липозоми с положителен електричен заряд. Съхранява се при +4°C.

- TurboFect™ (Fermentas; кат. № R0531) – трансфектиращ реагент, представляващ воден разтвор на катионен полимер. Съхранява се при +4°C.
- Polybrene® (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-134220) – поликатионен полимер, който неутрализира електростатичното отблъскване между вирионите и клетъчната мембрана. Концентрация: 10 mg/ml. Съхранява се при –20°C.
- Безсерумна хранителна среда OPTI-MEM® I (Invitrogen; кат. № 22600)

10.2. Апаратура и консумативи, използвани при размножаване на плазмидите

- One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen; кат. № C4040-10) – химиокомпетентни бактерии *E. coli*. Съхраняват се при –80°C.
- LB Broth (Sigma-Aldrich; кат. № L3022) – прах за приготвяне на течна среда LB (Luria-Bertani)
- LB Agar (Sigma-Aldrich; кат. № L2897) – прах за приготвяне на твърда среда LB-агар
- Ампицилин (Sigma-Aldrich; кат. № A2804)
- Стерилни Ерленмайерови колби
- Инкубатор с клатачен механизъм

10.3. Апаратура и консумативи, използвани при изолиране и пречистване на размножените плазмиди

- PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega Corporation; кат. № A2392) - комплект за изолиране на плазмиди от бактериални клетки. Комплектът съдържа:
 - разтвор за ресуспендиране на бактериалните клетки;
 - разтвор за лизиране на бактериалните клетки;
 - неутрализиращ разтвор;
 - PureYield™ Clearing Columns – пречистващи колонки;
 - PureYield™ Maxi Binding Columns – свързващи колонки;
 - разтвор за отмиване на ендотоксините (концентрат);
 - разтвор за промиване на колонките (концентрат).
- Вакуумна помпа

- Устройство за разпределяне на вакуума с 20 отвора за свързване с долните краища на колонките
- Центрофуга (Eppendorf)
- Изопропилов алкохол
- 96%-ен етанол
- Вода, несъдържаща нуклеази

10.4. Апаратура и консумативи, използвани при линеаризиране на плазмидите

➤ Рестрикционна ендонуклеаза (рестриктаза) PvuI (Fermentas; кат. № ER0621). Върви в комплект с реакционен буфер R, който съдържа 10 mM Трис-НСl (рН 8,5 при 37°C), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl и 0,1 mg/ml говежди серумен албумин. Съхраняват се при -20°C. Ензимът разпознава следния палиндром и го срязва на местата, отбелязани със стрелки:



- QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN; кат. № 28104) – комплект за пречистване на ДНК-молекули с дължина между 100 и 10 000 bp. Комплектът съдържа:
- колонки QIAquick Spin;
 - буфер PB;
 - буфер PE (концентрат);
 - буфер EB;
 - рН-индикатор;
 - събирателни епруветки (2 ml).
- 96%-ен етанол
- Термоциклер Mastercycler Gradient (Eppendorf)

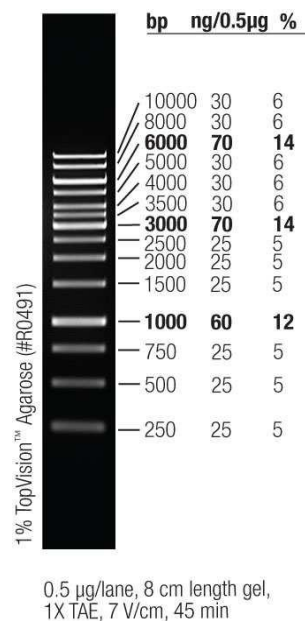
10.5. За електрофоретичен анализ на линеаризираните плазмиди

- Электрофорезна камера
- Трансформатор
- Агароза (Sigma-Aldrich; кат. № A9539)

- 10× TBE-буфер, приготвян по следната рецепта:

108 g трис и 55 g борна киселина се разтварят в 900 ml дестилирана вода. Добавят се 40 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) и дестилирана вода до краен обем 1 l. Съхранява се при стайна температура. Преди употреба се разрежда 20 пъти.

- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas; кат. № SM0311) – маркер за определяне на дължината на ДНК-молекулите. При електрофореза се разделя на 14 фракции (фиг. VIII.4.). Концентрацията на ДНК-фрагментите е 0,5 µg/µl в 10 mM Tris.HCl (pH 7,6) и 1 mM EDTA. Условия на съхранение: –20°C.



Фиг. VIII.4. Електрофоретично разделяне и дължина на отделните ДНК-фрагменти в маркера GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder.

- 6× оцветяващ разтвор за нанасяне на пробите върху гела (Fermentas; кат. № R0611). Състав: 10 mM Трис.HCl (pH 7,6), 0,03% бромфенолово синьо, 0,03% ксилен цианол FF, 60% глицерол и 60 mM EDTA.

- Разтвор на етидиев бромид с концентрация 2 µg/ml
- UV-трансилюминатор Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, САЩ)

10.6. За селекция на стабилно трансфектирани клетки

- G418-дисулфат (Sigma-Aldrich; кат. № A1720) – аминогликозиден антибиотик
- Пуромицин дихидрохлорид (Santa Cruz Biotechnology; кат. № sc-108071) – аминоклеозиден антибиотик, инхибиращ протеиновия синтез. Концентрация: 20 mg/ml. Условия на съхранение: –20°C.

Изследванията в дисертационния труд 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).