

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО
ИНЖЕНЕРСТВО

инж. Светла Желязкова Тодинова

ТЕРМОДИНАМИЧЕН ПРОФИЛ
НА ПЛАЗМЕННИЯ ПРОТЕОМ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за присъждане на научна и образователна степен “доктор”

Научен ръководител:

проф. Стефка Германова Танева, дбн

Рецензенти:

акад. Борис Гоцев Тенчов, дбн

доц. Красимира Николова Идакиева, д-р

Научна специалност:

4.3 – Биологически науки

(стар шифър – 01.06.08 – Биофизика)

София, 2013

СЪДЪРЖАНИЕ

Използвани съкращения	4
УВОД	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
1. МЕТОДИ И ОБЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ	8
1.1. Обекти на изследването	8
1.2. Диференциална сканираща калориметрия	8
1.3. Статистически анализ на термограми на кръвна плазма и серум	9
1.4. Електрофореза на серумни белтъци	10
1.5. Определяне на свободни леки вериги	10
2. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	11
2.1. ДСК профили на кръвна плазма и серум от здрави индивиди	11
2.2. Изследване на кръвен серум от пациенти с множествен миелом	12
2.3. ДСК профили на ММ със секрция на ВJ белтък и несекреторен миелом	16
2.4. Сравняване на ДСК профилите на серуми от ММ със секрция на Igs, ВJMM и несекреторен миелом	19
2.5. Дискусия на термодинамичното поведение на серум от пациенти с ММ	20
2.6. Колоректален карцином и карцином на стомаха	22
2.7. Дискусия на ДСК класификацията на колоректален карцином и карцином на стомаха	26
3. ОБОБЩЕНИЕ	28
4. ИЗВОДИ	31
СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ	32
ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА	33
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ	34
ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ	35

Използвани съкращения

ДСК - диференциална сканираща калориметрия

T_m - температура на прехода

c_p^{ex} - специфичен топлинен капацитет на преходите

ΔH_{cal} - енталпия на прехода

ΔG - свободна енергия на Гибс

ΔS - ентропия

T_{FM} - температура на първия момент на термограмите

P - метрично разстояние

r - коефициент на корелация

ρ - метрично сходство

SPE - електрофореза на серумни белтъци/капилярна електрофореза

ISS - международна система за оценяване

HSA - човешки серумен албумин

Tf - трансферин

Ig(s) - имуноглобулин(и)

VJ - белтък на Бенс Джоунс

FLC - свободни леки вериги

MM - множествен миелом

MM-Igs - множествен миелом със секрция на моноклонален имуноглобулин

VJ MM - множествен миелом със секрция на VJ белтък

NSMM - несекреторен множествен миелом

CRC - колоректален карцином

GC - карцином на стомаха

T - температура

N - нативно състояние

D - денатурирано състояние

УВОД

Разработването на нови методи за ранна диагностика и мониторинг на онкологични заболявания, разбирането на механизмите на заболяванията на молекулно ниво, както и намирането на подходящи способи за индивидуализирана терапия са предизвикателства, които продължават да стоят пред съвременната медицина. Като цяло диагностиката използва скъпи и/или инвазивни тестове и често ракът се открива в напреднал стадий на заболяването. За това е необходимо разработването на нови подходи за диагностика в ранен стадий. Една от съвременните тенденции е търсене на биомаркери в биологични течности и клетки, за което се използват аналитични методи като протеомика. Напредъкът в мас-спектрометрията, изчислителните методи, автоматизираният софтуер и съхранението на големи бази данни са проправили път за развитие на все по-усъвършенствани методи за протеомен анализ.

Кръвният протеом съдържа безценен запас от биомаркери, които отразяват физиологичното състояние на всички тъкани. Разнообразието от белтъци и модифицираните им форми в клетките е отражение на моментните физиологични и патологични състояния, а комплексната химия на микрообкръжението на тумора генерира уникални характеристики на макрообкръжението му в кръвта. Настоящият набор от биомаркери, обаче, не позволява да се детектират карциноми в ранен стадий, а понякога дори води до погрешно класифициране на доброкачествени състояния. Очаква се в бъдеще да се характеризират хиляди индивидуални плазмени белтъци/пептиди с помощта на протеомика и да се разкрият все по-голям брой надеждни биомаркери, които ще отразяват точно физиологичното и патологично състояние на всяка тъкан в тялото.

Неотдавна диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) беше приложена като нов подход за диагностика и мониторинг на заболявания. ДСК е високо чувствителна техника, която измерва температурно-индуцирани конформационни преходи на биомолекули и класически се използва за изследване на температурната стабилност на белтъци и по-комплексни биологични системи, липидни фазови преходи, както и за дизайн на лекарствени препарати. *Garbett et al. (2007)* първи разкриват възможността за приложение на ДСК в медицината. Авторите изследват температурното поведение на кръвна плазма от здрави и болни индивиди и показват типична ДСК термограма за здрави индивиди, която действително драстично се

различава от тази за пациенти с ревматоиден артрит, мозъчни тумори, Лаймска болест. Michnic et al. (2009) установяват съществени разлики и между термограмите на кръвен серум от пациенти с хронична обструктивна белодробна болест и от здрави индивиди.

Интересът към прилагането на ДСК като диагностичен метод нараства, тъй като тази техника е неинвазивна за пациентите и предоставя начин за бързо проследяване на измененията на термодинамичното поведение на кръвната плазма или кръвен серум, свързани или с промяна на концентрацията на съдържащите се в плазмата белтъци или с отнемването на техните характерни температурно-индуцирани конформационни преходи, дължащо се на свързването им с лиганди (тумор-специфични маркери).

Утвърждаването на ДСК като нов подход в диагностиката и проследяването на болести изисква широкоспектърни проучвания на различни заболявания. Като стъпка в тази насока в тази работа е представено задълбочено ДСК изследване на 458 пациенти, диагностицирани с множествен миелом (ММ) и с карцином на епителни тъкани в различни стадии и локализация - колоректален карцином (CRC) и карцином на стомаха (GC). ДСК анализът на ММ е комбиниран с електрофореза на серумни белтъци и "Freelite" тест за определяне концентрациите на секретиранияте в серума моноклонални имуноглобулини (парапротеини или М белтъци) и свободни леки вериги, които служат като биомаркери на този тип неоплазия. Представените резултати разкриват, че всяко от изследваните заболявания може да се характеризира с няколко групи от ДСК профили. Много малък брой ММ термограми имат сходни термодинамични характеристики с термограми на CRC и GC. Останалите ММ профили се различават ясно от тези на колоректален карцином и карцином на стомаха. От друга страна ДСК групите на карцином на стомаха са почти идентични с две от групите на колоректалния карцином, което вероятно се дължи на близкият им епителен произход.

Представените резултати разкриват потенциала на ДСК подхода за разграничаване на онкологични заболявания с различна природа и особено за диагностицирането на несекреторен миелом, за който все още липсват надеждни биомаркери.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Протеомът на кръвна плазма и серум е ценен източник за откриване на биомаркери за различни болести. Калориметрията като метод силно чувствителен към концентрацията, конформацията и взаимодействието на белтъците с други молекули, би позволила да се наблюдават незначителни промени в плазмения протеом, свързани с патологични процеси.

Целта на изследванията, представени в дисертационния труд, бе установяване на нови калориметрични маркери за злокачествени заболявания, хематологични и онкологични, и оценка на потенциала на термодинамичния подход за диагностика на тези заболявания.

За постигането на тази цел са дефинирани следните конкретни задачи:

- Определяне на типични (референтни) ДСК профили (термограми) на кръвен протеом (плазма и серум) от здрави индивиди (контроли) и определяне на термодинамичните параметри на наблюдаваните преходи в термограмите: температура (T_m), специфична топлемост (c_p^{ex}) и енталпия (ΔH_{cal}) на прехода, и температура на първия момент на термограмите (T_{FM}).

- Изследване термодинамичното поведение на серум от пациенти с множествен миелом със секретирание на моноклонални имуноглобулини, на белтъка на Бенс Джоунс (BJ) и несекреторен миелом (NSMM), определяне на термодинамичните параметри и сравняването им с тези, типични за здрави индивиди. Определяне нивата на основните серумни белтъци – албумин, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 и γ – глобулини и нивото на М белтъците с електрофореза на серумни белтъци, както, и нивата на свободните леки вериги и отношението κ/λ с помощта на „Freelite” теста. Класифициране на регистрираните ДСК профили на пациенти с MM, с различен М изотип (IgG, IgA и IgM) и леки вериги (λ и κ) на базата на техните термодинамични параметри.

- Анализ на термодинамичните характеристики на кръвна плазма на пациенти с колоректален карцином и карцином на стомаха и на резултатите от

стандартните лабораторни тестове за туморните маркери CEA, CA 19-9 и CA 125. Термодинамична класификация на изследваните карциноми.

- Статистически анализ на регистрираните ДСК профили на кръвна плазма и серум на пациенти, диагностицирани с ММ (секреторен, ВJ и NSMM), CRC и GC. Определяне на метричното разстояние (P), коефициента на корелация (r), и метричното сходство (ρ) за характеризиране на термограмите спрямо референтна група от термограми за здрави индивиди.

1. МЕТОДИ И ОБЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ

1.1. Обекти на изследването

Проучването включва контролна група от 53 здрави доброволци на възраст (57 ± 14 г.); 370 пациенти, диагностицирани с ММ (58 ± 13 г.), от които 47 са диагностицирани с ММ, IgG изотип, 12 - с IgA, 6 - с IgM, 95 - с ВJ и 210 са с NSMM; 74 пациенти с CRC (63 ± 11 г.) и 8 пациенти с GC (59 ± 15 г.).

Кръвните проби от пациенти с ММ, CRC и GC бяха предоставени от Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София и Специализираната болница за активно лечение по онкология, София, след получаване на информирано съгласие от пациентите. Изследванията са одобрени от етичните комисии на болниците.

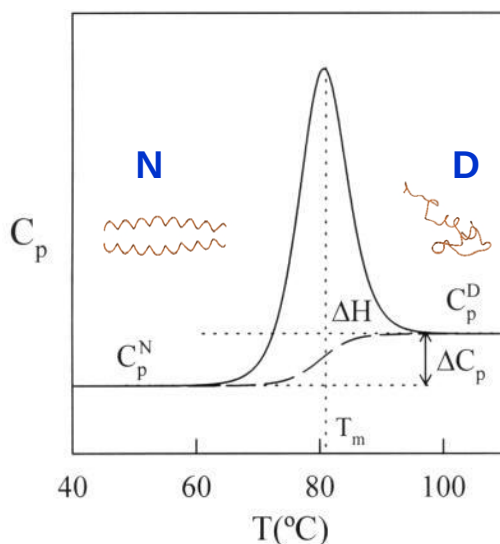
Подбраните за изследването пациенти с CRC и GC не са били подложени на химио- и радиотерапия. Туморните маркери CEA, Ca 19-9 и CA 125, както и стадия на заболяването, са определени за всички пациенти.

1.2. Диференциална сканираща калориметрия

ДСК е високо чувствителна техника за регистриране на конформационни преходи на биологични молекули и комплексни системи, и определяне на термодинамичните параметри на денатуриране. ДСК кривата измерва топлинния капацитет (C_p) на молекулния разтвор като функция от температурата (Фиг. 1) и е

единственият метод за директно определяне на калориметричната енталпия на процеса на денатурация ΔH_{cal} :

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_1}^{T_2} C_p \cdot dT$$



Фигура 1. Схематично представяне на температурно-индуцирано разгъване на глобуларен белтък.

N – нативно състояние; *D*– денатурирано състояние; C_p^N - топлинен капацитет на нативното и C_p^D - топлинен капацитет на денатурираното състояние; T_m – температура на прехода; ΔH – енталпия на прехода

Температурната денатурация на кръвен серум и плазма е проследена с помощта на високочувствителни микрокалориметрични системи на базата на блокове на Привалов ДАСМ-1 и ДАСМ-4. Определени са следните параметри: температура, T_m и топлинен капацитет, C_p^{ex} на последователните преходи в термограмите, температура на първия момент, T_{FM} (дефинирана като температурата, при която 50% от кръвния протеом е денатуриран) и енталпия, ΔH_{cal} (интегрираната площ под ДСК кривата).

Термограмите са анализирани със софтуерен пакет Origin.

1.3. Статистически анализ на термограми на кръвна плазма и серум

За анализ на получените резултати е приложен разработеният от *Fish et al. (2010)* алгоритъм за анализ и класифициране на ДСК профили. Степента на сходство между тествана крива и референтна термограма се характеризира с два фактора: 1)

близост в пространството (P) - стандартизирано Евклидово разстояние, при всяка температурна точка и 2) сходство във формата, r (корелация). Две термограми може да са с висока степен на корелация, но поради вертикално мащабиране, да са разделени от нетривиални разстояния в пространството, и обратно, две термограми могат да бъдат пространствено близки, но слабо корелирани поради колебания или шум в данните. Затова, за да се оцени количествено приликата между тест- и референтна криви, използваната метрика е комбинация от P и r - метрично сходство (ρ):

$$\rho = \left(P^w R^{2-w} \right)^{1/2}$$

където $0 \leq w \leq 2$. След емпирична оптимизация се определя стойност на $w = 1.5$. Обхвата на ρ е $[0,1]$, като стойности, близки до 0 показват голяма разлика във формата, а стойности, близки до 1 – съответно голямо сходство. Метричното сходство ρ се използва за разграничаване на тест- от референтна крива.

1.4. Електрофореза на серумни белтъци

Електрофорезата на серумни белтъци се използва за определяне нивата на основните серумни белтъци – албумин (HSA), α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - и γ -глобулини. Методът позволява определянето на количеството на М белтъка, който често се синтезира при множествен миелом.

Измерванията са проведени в Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София с помощта на MINICAP, Sebia.

1.5. Определяне на свободни леки вериги

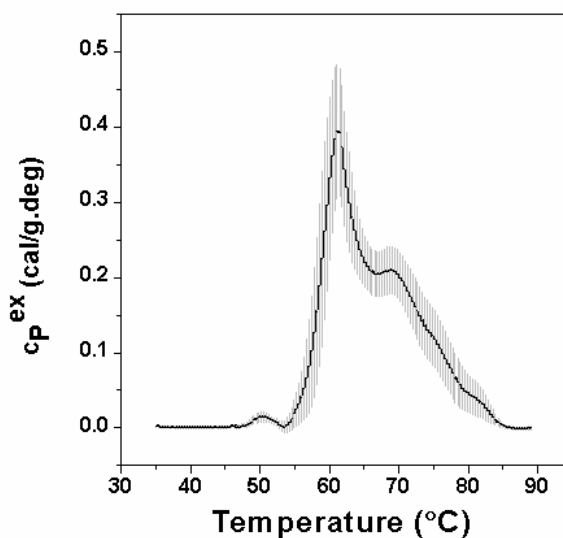
Концентрацията на свободни леки вериги (FLC) е определена посредством „Freelite”® (Binding Site, UK) тест. Количественият анализ на свободните имуноглобулинови леки вериги включва определяне на нивата на свободните κ и λ FLC в серума и оценка на отношението между тях. „Freelite” тестът за определяне на свободните леки вериги е проведен със SPAPLUS анализатор в Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, София.

2. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

2.1. ДСК профили на кръвна плазма и серум от здрави индивиди

Калориметричният профил на кръвна плазма от здрави индивиди се характеризира с 4 добре изразени прехода при 50 °C, 62 °C, 70 °C, 82 °C и рамо при около 76 °C (Фигура 2). Първият преход при 50 °C се дължи главно на фибриноген; основният преход при 62 °C на HSA (хаптоглобин или антитрипсин също могат да допринесат за този преход, макар и в много по-ниска степен); преходът при 70 °C се приписва на Ig; този при 75 °C - на комплемент белтъците C3 и C4, IgA, IgG и HSA, докато за последния високо-температурен преход значителен принос имат IgG и трансферин. Трябва да се има предвид, че и други белтъци допринасят за тези преходи макар и в по-малка степен поради по-ниската им концентрация в плазмата (*Garbett et al.*, 2009).

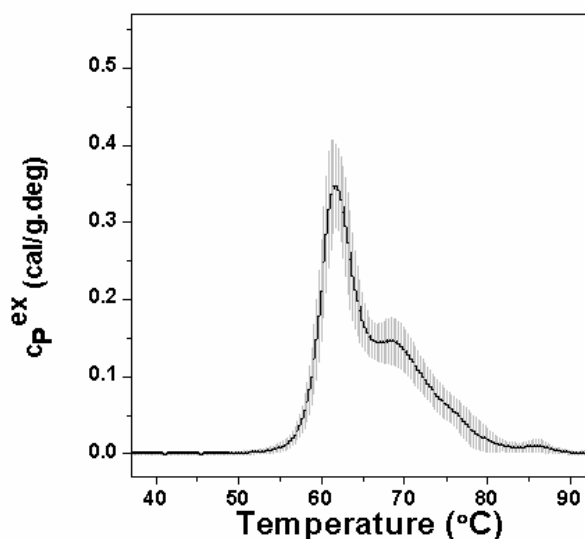
ДСК профилът на кръвен серум от здрави индивиди (Фигура 3) е много близък до този на кръвна плазма с тази разлика, че липсва първият ниско-температурен преход регистриран в профила на плазмата, съответстващ на фибриноген. Отношението на топлинните капацитети ($C_p^{ex}_{T1}/C_p^{ex}_{T2}$ за серум и $C_p^{ex}_{T2}/C_p^{ex}_{T3}$ за плазма), съответстващи на преходите на HSA и глобулините, има стойност близка до 2 за всички проби. Температурата на първия момент, T_{FM} , е идентична за всички здрави индивиди, приблизително 65 °C (плазма) и 64.03 °C (серум), и съответства на стойността, която вече е публикувана в (*Garbett et al.*, 2008).



Фигура 2. Термограма на кръвна плазма от здрави индивиди. Плътната линия е усреднена термограма от 32 здрави индивида, зашрихованата зона е стандартното отклонение.

Получените термограми от кръвен серум и плазма са използвани по-нататък в работата като референтни за тестване на (нови) термограми на здрави индивиди и на пациенти с изследваните заболявания.

ДСК термограмата на кръвна плазма (Фигура 2), получена от усредняването на 32 термограми на здрави доброволци, съответства на установената от групата на Chaires (Garbett et al., 2008, 2009).



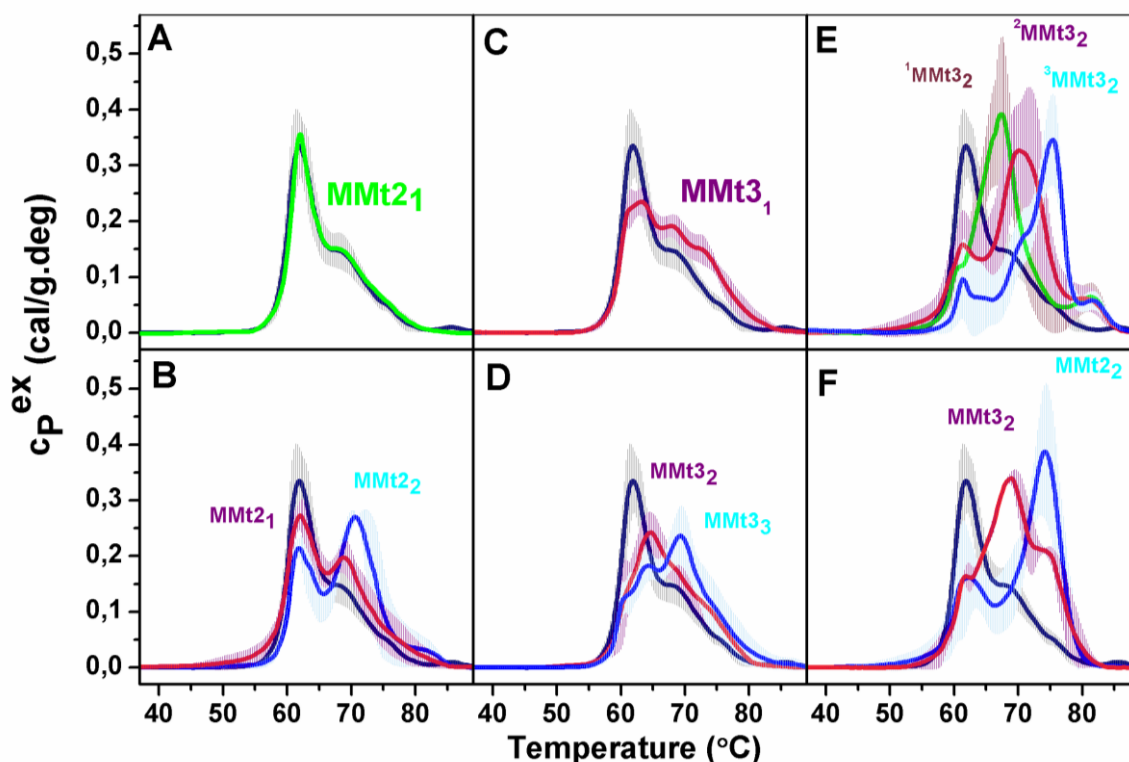
Фигура 3. ДСК термограма на серум от здрави индивиди. Плътната линия е усреднената термограма от ДСК-профилите на 21 здрави доброволци, заширикованата зона е стандартното отклонение.

2.2. Изследване на кръвен серум от пациенти с множествен миелом

Множественият миелом е злокачествено заболяване на кръвта, свързано с размножаването на злокачествени плазмоцити в костния мозък и най-често е съпроводено със секретирането на моноклонални имуноглобулини или свободни леки вериги.

Кръвен серум от пациенти с ММ беше изследван за пръв път с помощта на ДСК. Първоначалните ни изследвания бяха съсредоточени върху намиране на характерен за това заболяване калориметричен профил. Установено беше, че ДСК термограмите на серум от пациенти с ММ със секретиране на М белтък се различават от тези на здрави индивиди и могат да се разграничат два или три добре изразени прехода (Фигура 4) с T_m и C_p^{ex} , които се различават в зависимост от нивата на М белтъка и HSA в серума. Рядко (в 19.5% от случаите) се наблюдава допълнителен четвърти преход, или рамо.

Не се установява един характерен ДСК профил за всички изследвани пациенти с миелом. Според броя на преходите в термограмите, те са групирани в следните подгрупи: MMt2 и MMt3, съответно термограми с два и три прехода.



Фигура 4. Характерни ДСК профили на кръвен серум от пациенти с ММ. Усреднени стойности (плътните линии) на термограмите и стандартното отклонение (ирихи) на кръвен серум от здрави индивиди (тъмно сива плътна линия и светло сиви ирихи) и ММ пациенти (зелени, сини, лилави и тъмно сиви линии) (A-F). Класът и средната концентрация на ММ белтъка за ММ подгрупите са дадени в Таблица 1. Наименованията на подгрупите са дадени в съответния цвят във всеки панел. За по-голяма яснота трите подгрупи в панел E, различаващи се по T_m на основния преход, са обозначени с горен индекс.

Както при контролните термограми, за 37% от изследваните случаи топлинният капацитет е по-висок за първия ниско-температурен от този за втория високо-температурен преход ($C_p^{ex}_{T1}/C_p^{ex}_{T2} > 1$). Противоположна тенденция ($C_p^{ex}_{T1}/C_p^{ex}_{T2,3} < 1$), т.е. стойността на топлинния капацитет е съществено по-ниска за първия преход отколкото за следващия втори или трети температурен преход, е характерна за оставащите 63% от ММ случаите. Първият преход, регистриран при 61-62 °C, има стойност на $C_p^{ex}_{T1}$ сравнима (Фигура 4 A, MMt₂₁), незначително (Фигура 4 B, MMt₂₁) или съществено (Фигура 4 B, MMt₂₂ и Фигура 4 MMt₂₁ и MMt₃₁, C – F) по-ниска от тази на контролата в зависимост от концентрацията на М белтъка (Таблица 1).

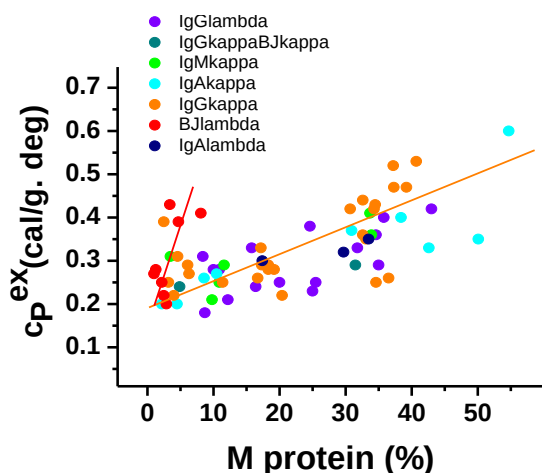
Таблица 1. Термодинамични параметри, определени от ДСК профилите на ММ подгрупите и контролата. Представени са усреднената стойност и стандартното отклонение за стойностите на топлинните капацитети ($C_p^{ex}_{T1}$ и $C_p^{ex}_{T2}$) и тяхното отношение ($C_p^{ex}_{T1}/C_p^{ex}_{T2}$) за първия и втория температурен преход. Наименованията на подгрупите съответстват на тези, представени на Фигура 4А–Е. Средната стойност на концентрация на М белтъка, както и стандартното отклонение, са дадени за всяка група.

Подгрупи Фигура 4	М белтък %	$C_p^{ex}_{T1}$ (cal/g. deg)	$C_p^{ex}_{T2}$ (cal/g. deg)	$C_p^{ex}_{T1}/C_p^{ex}_{T2}$	T_{FM} (°C)
контрола	-	0.37 ± 0.05	0.15 ± 0.03	2.56 ± 0.72	64.0 ± 1.1
A MMt ₂₁	3.9 ± 1.2	0.37 ± 0.05	0.15 ± 0.03	2.46 ± 0.22	64.5 ± 1.5
B MMt ₂₁	11.7 ± 7.2	0.28 ± 0.03	0.21 ± 0.04	1.34 ± 0.24	65.6 ± 1.2
B MMt ₂₂	23.0 ± 7.4	0.21 ± 0.04	0.28 ± 0.01	0.74 ± 0.14	68.6 ± 1.3
C MMt ₃₁	4.8 ± 5.0	0.23 ± 0.03	0.20 ± 0.02	1.17 ± 0.08	66.3 ± 1.9
D MMt ₃₂	6.2 ± 6.7	0.16 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.66 ± 0.20	67.2 ± 1.4
D MMt ₃₃	12.3 ± 6.9	0.14 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.78 ± 0.27	68.1 ± 1.8
E ¹ MMt ₃₂	36.8 ± 3.8	0.19 ± 0.14	0.40 ± 0.11	0.48 ± 0.29	67.2 ± 0.9
E ² MMt ₃₂	35.7 ± 3.9	0.19 ± 0.03	0.39 ± 0.10	0.53 ± 0.20	70.4 ± 1.1
E ³ MMt ₃₂	35.1 ± 1.8	0.12 ± 0.08	0.31 ± 0.10	0.60 ± 0.35	73.4 ± 1.0
F MMt ₃₂	38.1 ± 6.4	0.16 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.49 ± 0.08	68.7 ± 0.3
F MMt ₂₂	40.8 ± 11.0	0.18 ± 0.08	0.40 ± 0.12	0.70 ± 0.72	71.3 ± 2.0

Следващите преходи и/или рамена след първия преход в ММ термограмите се наблюдават при 63.5-64.6 °C, 68-70 °C или 73-75 °C, и само при случаите на ММ IgG изотип, се появява преход с ниска енталпия при 81-82 °C (Фигура 4 Е). Важно е да се отбележи, че последният преход на “контролната” термограма, при около 85 °C, липсва при 80.5% от изследваните случаи на ММ, което може да се дължи или на силно намаленото ниво на трансферин в серума, които се очаква да денатурират при тази температура (Garbett *et al.*, 2009), или на свързването му с лиганд, предизвикващ отместване на температурата на разгъване. Голям интерес представлява, но е извън обсега на тази работа, да се изследва дали тази обща черта за всички изследвани ММ случаи може да служи като индикатор за злокачествено заболяване. Последният преход при 85 °C, характерен за здрави индивиди, се наблюдава само за ММ случаи, IgG изотип, отместен е с 2 °C към по-ниски температури и има по-висока стойност на C_p^{ex} за всички случаи на ММ, IgG изотип в сравнение с контролата.

Подгрупите термограми, показани на Фигура 4, се отнасят за две нива на М белтъка в серума - от 1.3 до 32%, панели А – D, и над 32%, панели Е и F. Термограмите за ММ със секретирание на М белтък с концентрация под 32% включват различни М изотипове, а също малък брой случаи ВJ ММ и несекреторен миелом (Фигура 4 А-D), докато тези с концентрация по-висока от 32% (Фигура 4 Е и F) съответстват или на IgG (Фигура 4 Е) или на IgA случаите (Фигура 4 F).

Всички ММ ДСК термограми се различават съществено от контролната група с изключение на 8 случая, усредненият профил за които е представен на Фигура 4 А. Въпреки сходството с ДСК профила на здрави индивиди, при тези термограми не се регистрира последният преход при 85 °C.



Фигура 5. Зависимост на топлинния капацитет, C_p^{ex} , от серумното ниво на М белтъка. Различните М изотипове са представени в различен цвят и концентрацията на М белтъка е изразена в процент от тоталния белтък.

вероятно това е резултат от взаимодействия белтък-белтък и/или лиганд-белтък, модифициращи денатурацията и стабилизиращи белтъците, които се разгъват в този температурен интервал.

Освен това установихме връзка между топлинния капацитет на основния температурен преход, който е единият от трите последователни калориметрични прехода, и концентрацията на М белтъка в серумните проби (Фигура 5). C_p^{ex} нараства с увеличаване на концентрацията на М белтъка (Фигура 5), докато М изотипа е произволно разпределен и не изглежда да има специфична връзка със стойността на C_p^{ex} на основния преход. Същата тенденция се наблюдава и при ВJ ММ, ефектът се

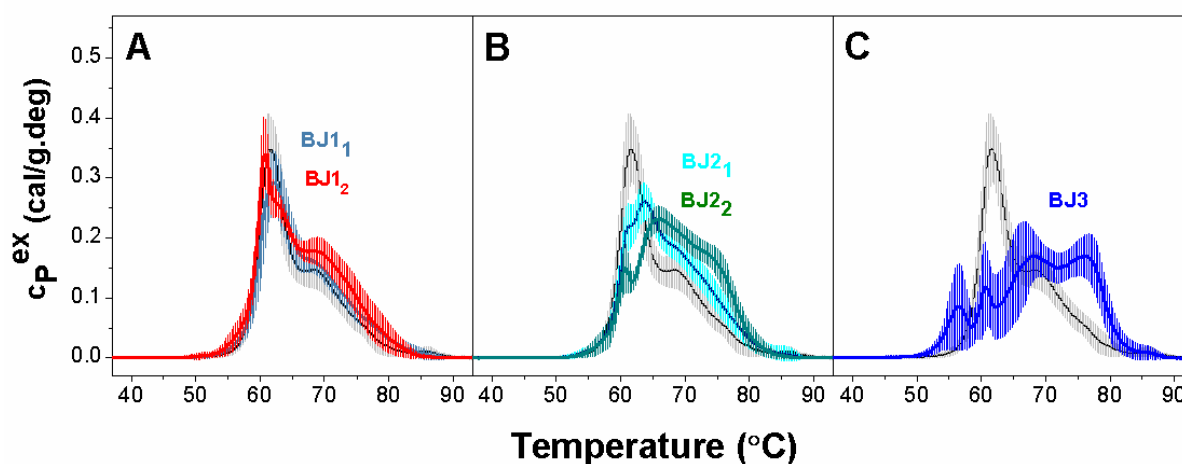
По-драстична разлика в ДСК профилите е установена при високи нива на М белтъка (33 - 54.7%). Наблюдават се три типични прехода, като средните температури на втория и/или третия преход са отместени към по-високите температури в сравнение с тези наблюдавани при ниски концентрации на М белтъка (Фигура 4 Е и F; Таблица 1). Важно е да се отбележи, че по-високите стойности на C_p^{ex} на втория преход са съпътствани със съществено отместване на прехода към по-високи температури (от 67 °C към 75 °C за IgG и от 69 °C до 74 °C за IgA случаите). Най-

проявява даже когато BJ белтъкът е в доста ниска концентрация (1.3 - 8% за случаите, представени на Фигура 5) сравнено със случаите на различните М изотипове (Фигура 5). Това би могло да се свърже с факта, че ММ със секретирание на леки вериги е по-агресивен от типичната ММ форма (Dispenzieri et al., 2009; Siegel et al., 2009).

2.3. ДСК профили на ММ със секречия на BJ белтък и несекреторен миелом

Случаите на ММ със секречия на BJ и NSMM, представляват особен интерес. BJ ММ е по-агресивен тип миелом, докато случаите на несекреторен миелом са по-трудни както за диагностициране, така и за проследяване отговора на терапия на пациентите. Тези обстоятелства насочиха нашето внимание към по-детайлното им изследване.

Приблизително 15% от ММ са свързани със секретирание само на BJ белтък (Abraham et al., 2003; Stevens et al., 1999) в урината и серума. Всъщност първият използван *in vitro* тест за рак е този за определяне на BJ белтъка.



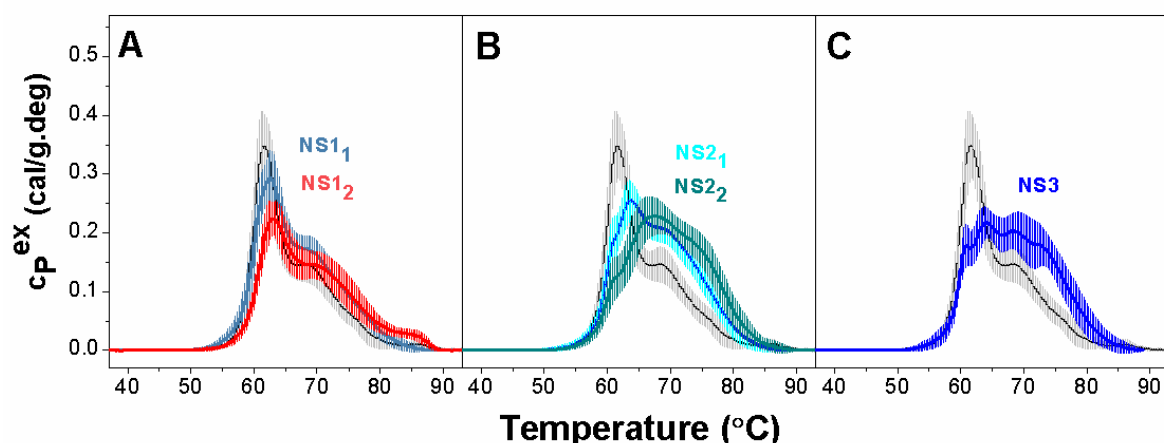
Фигура 6. ДСК профили на кръвен серум от пациенти с BJ ММ подгрупи. Представени са усреднените стойности (плътни линии) на термограмите и стандартното отклонение (щрихи). Подгрупите са означени в цвят, съответстващ на усреднените термограми. За сравнение на всеки панел е показана усреднената термограма за здрави индивиди (черна линия) и стандартното отклонение (сиви щрихи).

Не беше установен един типичен калориметричен профил и за серуми от пациенти, диагностицирани с BJ. На BJ ММ термограмите могат да бъдат разграничени 2, 3 или 4 последователни прехода, които се отличават по стойността на C_p^{ex} . Според

боя на наблюдаваните преходи, калориметричните профили са класифицирани в три групи BJ1 – BJ3, като тези от BJ1 групата се характеризират с два, BJ2 групата с три и BJ3 с четири последователни прехода. В BJ1 и BJ2 групите се разграничават две подгрупи, отличаващи се една от друга по температурата на основния преход, който е отместен към по-ниска и по-висока температура, съответно. Усреднените профили и стандартното отклонение за всяка една от BJ групите/подгрупите, заедно с типичната термограма на здрави индивиди, са представени на Фигура 6. Отместването на основния преход, съответстващ на HSA е характерно за 88% от изследваните случаи и може да се дължи на свързването на BJ белтъка или други лиганди/маркери към HSA. Особено драстични разлики се наблюдават при BJ3 групата, която включва пациенти, за които са регистрирани много високи нива на BJ белтъка ($> 10\%$). BJ3 калориметричната група е уникална и с наличието на един ясно изразен пик при $57\text{ }^{\circ}\text{C}$, който най-вероятно може да бъде приписан на присъствието на BJ белтъка, чието ниво е много високо за всички случаи, включени в тази група. Важно е да се отбележи, че T_m на този преход е близък до температурата на денатуриране на изолиран BJ белтък, $T_m \approx 57\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sikkink and Ramirez-Alvarado, 2008).

При по-голямата част от BJ термограмите (92%) се наблюдава стабилизиране на серумния протеом спрямо температурно денатуриране, температурата на първия момент T_{FM} е отместена към по-високи температури за всички подгрупи, сравнени с контролата (Таблица 2). Това стабилизиране на серумния протеом би могло да се дължи главно на свързването на HSA с друг неидентифициран маркер или леки вериги.

Протеомът на пациенти с NSMM също се характеризира с модифициран термодинамичен портрет. Подобно на BJ MM, регистрираните 201 калориметрични профили са класифицирани в три групи NS1 – NS3, NS1 и NS2 допълнително са разделени на две подгрупи (Фигура 7). Сравнението на термодинамичните и статистически параметри на NSMM групите с тези на BJ MM, показва силно сходство между двата миеломни типа: (1) NS1₁ и BJ1₁ подгрупите са най-близки до контролата; (2) основният преход има силно намален топлинен капацитет; (3) NS3 групата, както BJ3 се характеризира с четири прехода, но за разлика от BJ3, при NS3 те имат много близки c_p^{ex} стойности (Фигура 7); (4) T_{FM} е силно отместена с 3-6 $^{\circ}\text{C}$ в сравнение с тази на контролата и (5) статистическите показатели значително се отклоняват при NS1₂ – NS3, от тези определени за тест-контролни термограми, като за подгрупите NS1₁ и BJ1₁ те са по-близко до референтната група (Таблица 2).



Фигура 7. ДСК профили на кръвен серум от пациенти с NSMM. Представени са усреднените стойности (плътни линии) на термограмите и стандартното отклонение (ирихи). Подгрупите са означени в цвят, съответстващ на усреднените термограми. За сравнение на всеки панел е показана усреднената термограма за здрави индивиди (черна линия) и стандартното отклонение (сиви ирихи).

Таблица 2. Термодинамични параметри, определени от ДСК профилите на BJ MM, NSMM групите и контролата. Представени са усреднената стойност и стандартно отклонение на отношението $C_p^{ex} T_1 / C_p^{ex} T_2$ на топлинните капацитети на преходите, приписвани на HSA и глобулини, тоталната енталпия ΔH_{cal} , температурата на първия момент T_{FM} , статистическите параметри P , r и ρ . Наименованията на подгрупите съответстват на тези, представени на Фигури 6 и 7.

Фигура	Подгрупи	$C_p^{ex} T_1 / C_p^{ex} T_2$	ΔH_{cal} (cal/g. deg)	T_{FM} (°C)	P	r	ρ
5,6 A- C	контрола	2.56±0.72	3.13±0.34	64.0±1.1	0.755	0.975	0.800
5 A	BJ1 ₁	2.07±0.60	3.30±0.39	65.3±1.1	0.750	0.970	0.780
5 A	BJ1 ₂	2.23±0.62	3.77±0.47	65.7±1.3	0.720	0.940	0.740
5 B	BJ2 ₁	1.55±0.30	3.70±0.47	66.8±0.9	0.700	0.820	0.710
5 B	BJ2 ₂	1.37±0.19	3.60±0.29	68.3±0.9	0.640	0.650	0.630
5 C	BJ3	0.71±0.20	3.55±0.30	67.8±1.4	0.550	0.380	0.490
6 A	NS1 ₁	1.58±0.36	3.69±0.50	67.0±1.7	0.751	0.950	0.796
6 A	NS1 ₂	1.59±0.20	3.17±0.59	67.9±1.3	0.712	0.851	0.734
6 B	NS2 ₁	1.35±0.28	3.84±0.53	67.5±0.8	0.721	0.763	0.730
6 B	NS2 ₂	1.36±0.66	3.79±0.48	69.6±1.3	0.553	0.544	0.554
6 C	NS3	1.05±0.13	3.65±0.55	68.8±1.2	0.544	0.452	0.518

Отличителна характеристика на подгрупа NS1₂ е наличието на преход при около 85 °C, какъвто се наблюдава в термограмите на серум от здрави индивиди, но липсва в останалите NSMM, както и във всички BJ MM термограми и в голяма част от MM случаите със секречия на М-белтък (*Todinova et al., 2011*).

Наблюдаваните почти идентични термодинамични характеристики на калориметричните BJ MM и NSMM групи/подгрупи (Фигура 7, Таблица 2) вероятно отразяват сходни промени на серумния протеом и наличието на идентични маркери/лиганди, свързани със заболяването. В случая на BJ миелом моноклоналните FLC, които често се срещат в секреторния и несекреторен миелом, биха могли да бъдат този лиганд.

Данните от електрофорезата на серумни белтъци показват, че концентрациите на HSA, α 1-, α 2-, β 1-, β 2- и γ -глобулините са в норма за всички NSMM групи и за по-голяма част от случаите на MM със секречия на BJ. Единствено за BJ1 групата и BJ2₁ подгрупата, нивото на α 1 фракцията и γ -глобулините са извън референтните граници.

Стойностите на κ/λ отношението са извън референтните граници за 97% от BJ MM. Поради високи нива на κ или λ веригите, отношението κ/λ е аномално за случаите на BJ1 и BJ2 калориметричните групи. За повечето от изследваните BJ MM случаи, κ и λ веригите не могат да бъдат определени с помощта на “Freelite” теста. Това важи изцяло за случаите включени в BJ3 групата. В много малка част от изследваните BJ MM случаи (3%) κ/λ отношението е в референтните граници. Проследяването на отговора на лечение в тези случаи се осъществява главно с проследяване на концентрацията на BJ белтъка и имунохимични методи. В тези случаи ДСК би могла да се прилага като комплементарен метод.

За случаите на NSMM κ/λ отношението е извън референтните граници за 40% от разглежданите случаи, при 7% това отношение не е пресметнато поради твърде високите стойности на κ или λ веригите, а за останалите 53% от общия брой изследвани NSMM κ/λ е в норма. Трябва да се отбележи факта, че най-голям процент от пациентите, чиито термограми попадат в група NS1, имат отношение κ/λ в норма.

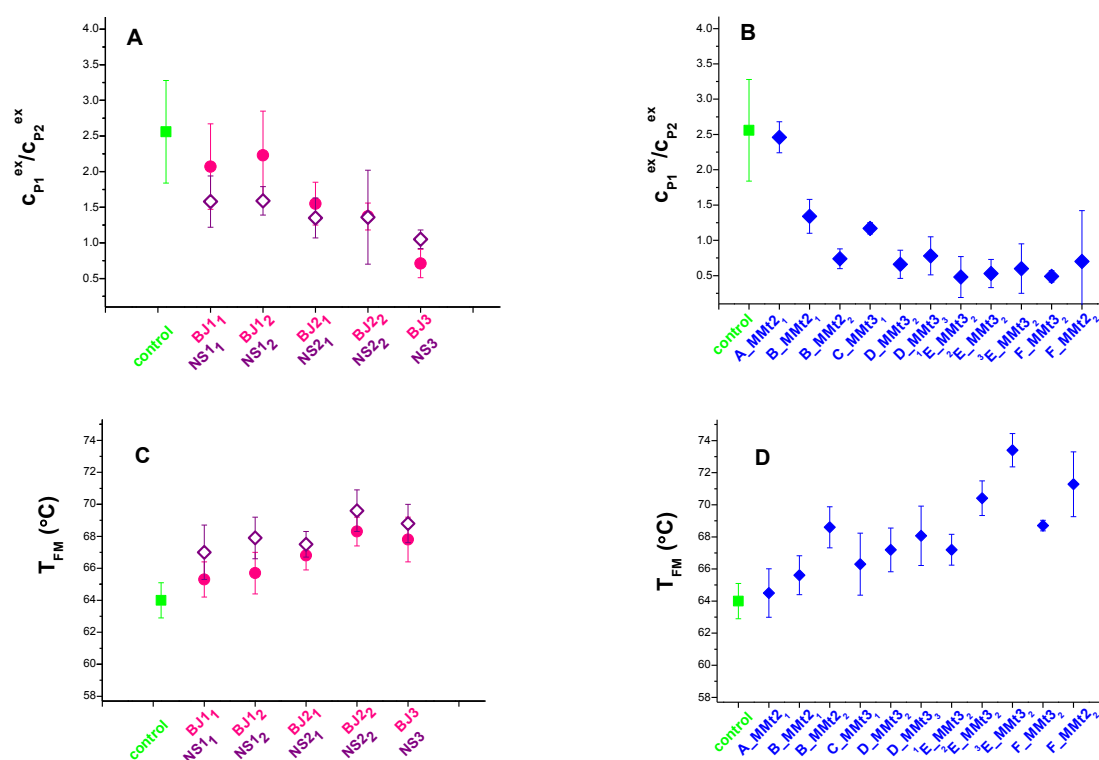
2.4. Сравняване на ДСК профилите на серуми от MM със секречия на Igs, BJ MM и несекреторен миелом

Отличителни термодинамични характеристики за MM-Igs, BJ MM и NSMM са:

(а) Стабилизиране на серумния протеом спрямо температурно денатуриране;

- (б) Намаление на отношението на топлинните капацитети албумин/глобулини;
- (в) Липса на преход при 85 °C в голям процент от ММ случаите (88%).

За разлика от IgG, IgA и IgM множествен миелом, където преходът, приписван на глобулините (Т3) се отмества значително към по-висока температура и топлинният му капацитет постепенно нараства с увеличаването на Igs нивото в серума (Фигура 4 Е и F), за ВJ ММ и NSMM се наблюдава изменение на T_m , но не и на топлинния капацитет на този преход (Фигура 6 и 7).



Фигура 8. Термодинамични параметри - C_{p1}^{ex}/C_{p2}^{ex} , T_{FM} за ДСК - класифицираните случаи на ММ със секретиране на М белтък (панел В, D и F), ВJ ММ (панел А, С, и Е) и NSMM (панел А, С, и Е). Означенията по абцисните оси съответстват на групите представени на съответните панели на Фигура 4, 6 и 7.

2.5. Дискусия на термодинамичното поведение на серум от пациенти с ММ

Калориметричните данни от кръвен серум на пациенти с ММ (със секретиране на имуноглобулини, ВJ белтък и несекреторен миелом) показват специфични разлики в термограмите, в T_m на температурните преходи, в броя и кооперативността на преходите и респективно в техния топлинен капацитет в сравнение с контролите. Не

установихме един характерен ДСК профил на кръвен серум от ММ, а ясно различаващи се няколко групи от профили, отразяващи изменения на съдържанието на серумните белтъци, протеомния състав и мрежата от молекулни взаимодействия.

Установихме, че ДСК профилите на ММ със секретирание на М белтък зависят от концентрацията на М белтъка и от неговия изотип, особено за високи концентрации на белтъка. Типично понижаване на c_p^{ex} на първия преход и осезателно повишаване на c_p^{ex} на втория и/или третия преход се наблюдава при високи нива на М белтъка. Ясно е, че повишаването на М белтъка води до повишаване на c_p^{ex} на високо-температурните (свързани с глобулините) преход(и) и отместване на T_m към по-високи температури - вероятно това стабилизиране се дължи на свързването на лиганди към някои от основните серумни белтъци (*Chen et al.*, 1996; *Jelesarov et al.*, 1999). Съпоставянето между калориметричните и електрофоретичните данни разкрива, че поне една част от HSA би трябвало да денатурира при по-висока температура в ММ серум от тази в серум на здрави индивиди, което може би се дължи на свързването на специфичен лиганд към HSA.

ДСК профилите на серум от пациенти с ВЈ ММ и несекреторен миелом също са хетерогенни. Както в случаите на ММ със секреция на М белтък, ДСК термограмите на ВЈММ и NSMM също бяха класифицирани в няколко калориметрични групи/подгрупи на базата на специфичните промени на термограмите и термодинамичните параметри: (1) брой на последователните термични преходи; (2) редуцирана стойност на $c_p^{ex} T_1 / c_p^{ex} T_2$ отношението (от 2.6 характерно за контролите до стойности в интервала 2.23-0.71 за ВЈ ММ и 1.58-1.5 за NSMM) и (3) отместване на T_{FM} от 64 °C за протеом на здрави индивиди към 65.3 - 68.3 °C за ВЈ ММ и 67 - 70 °C за NSMM. ДСК-базираните ВЈ ММ и NSMM групи/подгрупи показват значително отклонение в метричното сходство ρ , което има стойности в границите от 0.780 до 0.518 (Таблица 2). За сравнение, $\rho=0.8$ за тест-контролни термограми.

Нашите резултати ясно показват, че ДСК профилите на серумен протеом от ММ пациенти имат специфични характеристики, свързани с наличието на моноклонални глобулини, техния изотип, наличието на леки вериги и ВЈ белтъка, както и модифицирана мрежа от макромолекулни взаимодействия. Представените данни дават нова оценка за ММ и разкриват специфични калориметрични белези за това заболяване.

ДСК би бил особено полезен в случаите на NSMM, за който не могат да се открият биомаркери с електрофореза на серумни белтъци и FLC анализ . Модифицираните ДСК профили в тези случаи могат да служат като маркери.

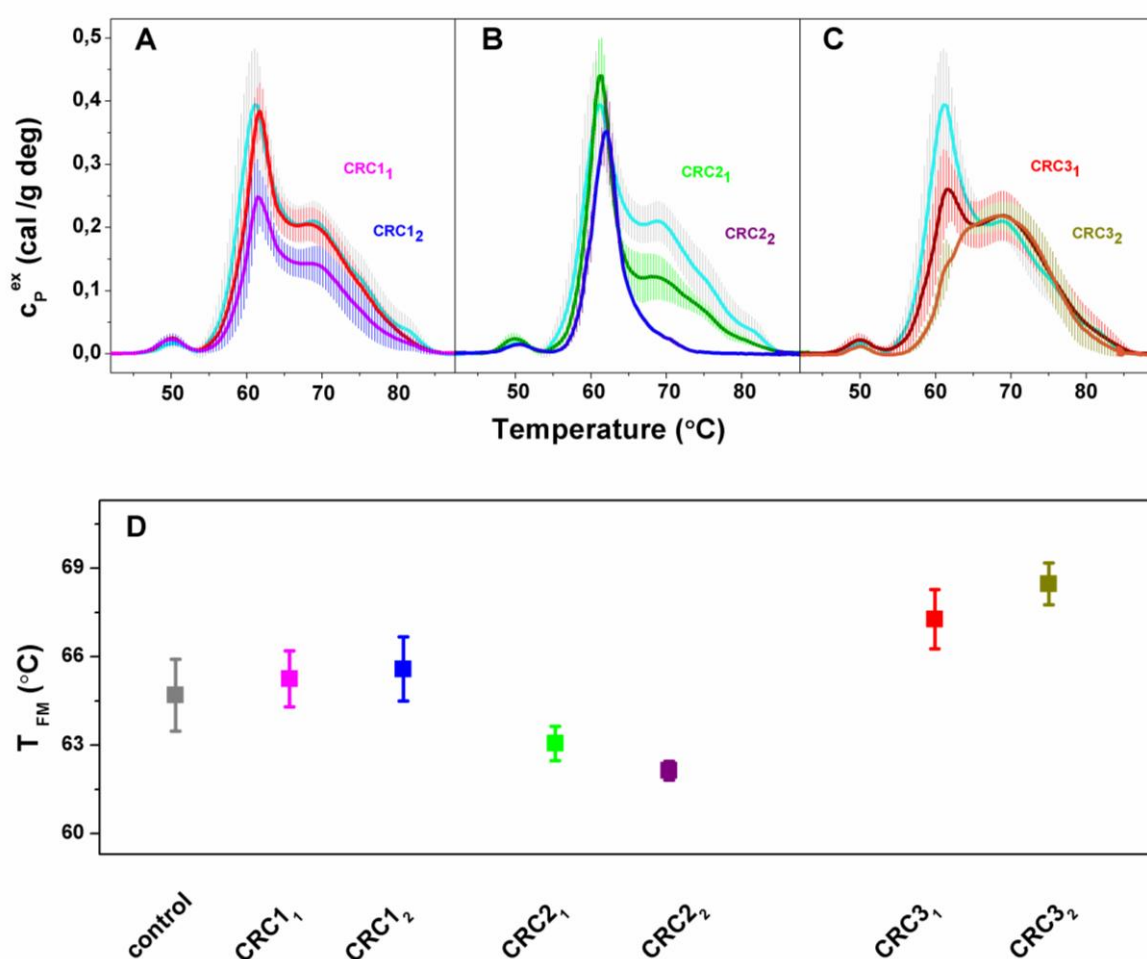
Така, установяването на различни групи от ДСК термограми от серум на ММ пациенти очевидно е свързано с многообразието на модификациите в серумния протеом, което се дължи на мрежа от взаимодействия, включваща белтък-белтък и белтък-лиганд взаимодействия (“интерактомика”) (Zolla, 2008; Zhou et al., 2004). Тази хетерогенност на ММ термограмите не е изненадваща и е напълно в съгласие с определението на множествения миелом като „не една болест, а по-скоро много”, като всеки един от подтиповете ММ са дефинирани от множество специфични генни и цитогенни нарушения (Fonseca et al., 2009, Moreaux et al., 2011).

2.6. Колоректален карцином и карцином на стомаха

Туморите на гастроинтестиналния тракт са сред най-често срещаните злокачествени заболявания и една от главните причини за смъртност при онкоболните в световен мащаб. Разнородният характер на това заболяване обуславя необходимостта от откриване на специфични маркери за точна характеристика на отделните подтипове CRC. В настоящата работа е представена една различна, термодинамична гледна точка за хетерогенността на CRC. Нашите данни показват няколко групи CRC с различни термодинамични характеристики, които се предполага, че се дължат на промяна на плазмения протеом и/или интерактом. Въпреки че мнозинството от пациентите, включени в това изследване, са в напреднал стадий на болестта, техните термограми не показват един единствен характерен профил, а могат да се разделят на три основни групи (6 подгрупи) в зависимост от термодинамичните им параметри.

ДСК термограмите на кръвна плазма от CRC пациенти се различават от типичната за здрави индивиди и за 78% от групата тази разлика е много силно изразена. В зависимост от отношението между топлинните капацитети на албумин- ($c_p^{ex_{T2}}$) и глобулин-свързаните ($c_p^{ex_{T3}}$) преходи, $cr^{ex_{T2}}/cr^{ex_{T3}}$, се обособяват три основни групи от CRC термограми, CRC 1-3, с отношение $cr^{ex_{T2}}/cr^{ex_{T3}}$: (1) малко по-ниско (Фигура 9 А), (2) значително по-високо (Фигура 9 В) и (3) драстично по-ниско (Фигура 9 С) от с това, установено за контролите (Таблица 3).

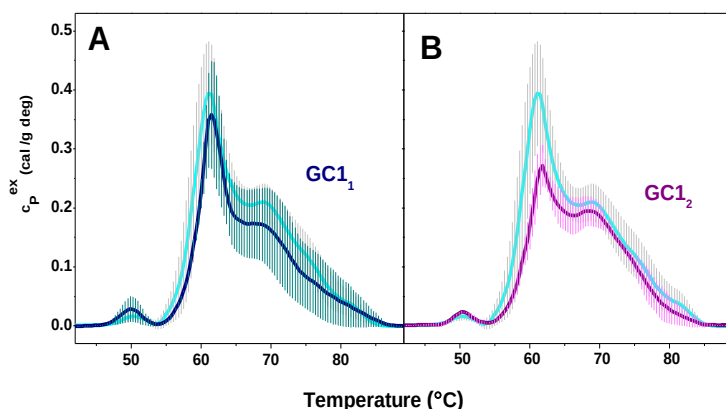
Всяка една от CRC групите може да се раздели на две подгрупи, които се различават по топлинния капацитет на преходите на албумин и глобулини, и по тоталната енталпия ΔH_{cal} . Сред всички групи термограми, CRC1₁ подгрупата е най-близка до контролната термограма на здрави индивиди, отношението $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$ и ΔH_{cal} са почти неразличими от стойностите за контролите (Таблица 3), но високотемпературният преход не е добре дефиниран. За подгрупа CRC1₂ ΔH_{cal} и стойностите на $c_p^{ex} T_2$ и $c_p^{ex} T_3$ са силно намалени, но отношението $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$ не се различава значително от това на CRC1₁ и на контролата (Таблица 3).



Фигура 9. ДСК профили на кръвна плазма на CRC пациенти. Усреднени термограми (плътна линия) и стандартно отклонение (защрихована област): контрола (светлосиня плътна линия и сиви щрихи) и CRC пациенти (червена линия, лилави щрихи (A), тъмно зелена линия, сини щрихи (B) и винено червена линия, оранжеви щрихи (C). Наименованията на подгрупите са показани със съответния цвят на панели A-C. На панел D е дадена T_{FM} за контролата и CRC подгрупите.

Стойността на $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$ отношението за CRC2 термограмите се увеличава драстично (то варира в границите 2.26 - 14.6), дължащо се на силно намаление на свързаната с глобулините $c_p^{ex} T_3$ стойност (Фигура 9, Таблица 3). Характерни особености на CRC2 термограмите са високата кооперативност на калориметричния профил, много по-силно изразена за CRC2₂ подгрупата (Фигура 9 В) и силното отместване на T_{FM} към по-ниски температури (Таблица 3). За разлика от група CRC2, за CRC3₁ и CRC3₂ стойностите на $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$ отношението са съответно около 1.3 и 0.69, т.е. два пъти по-ниски в сравнение с контролата (Таблица 3). CRC3₂ подгрупата показва драстично намаление на T2 прехода и основният преход има T_m , съответстващо на третия, свързан с глобулините преход. Характерно за CRC3 групата е стабилизиране на плазмения протеом, T_{FM} се отмества към по-високи температури (от 65 °C за контролата до 67.3 °C за CRC3₁ и до 68.6 °C за CRC3₂) (Фигура 9 D, Таблица 3).

Както при CRC класификацията се разграничат две подгрупи термограми на кръвна плазма от пациенти с карцином на стомаха - GC1₁ и GC1₂ (Фигура 10). Съотношението $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$ е значително по-ниско за GC1₂ (1.39 ± 0.14), отколкото за GC1₁ (2.19 ± 0.25) подгрупата. Тези подгрупи са сходни с подгрупите CRC1₁ и CRC3₁ на колоректален карцином (Фигура 9 А, С, Фигура 10 А и В, Таблица 3).



Фигура 10. Характерни профили на карцином на стомаха. Всяка усреднена група, GC1₁ (синя линия, А) и GC1₂ (пурпурна линия, В) е представена със съответното ѝ стандартно отклонение (црихи). Светлосинята линия и сивите црихи представят усреднената термограма за здрави индивиди и съответното ѝ стандартно отклонение.

Въпреки голямата разлика в отношението $c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$, могат да бъдат изтъкнати някои общи характеристики за по-голямата част от CRC ДСК профилите: 1) първият преход T1 се наблюдава за всички термограми и не е отместен (Фиг. 8); 2) отношението $c_p^{ex} T_1 / c_p^{ex} T_2$ се различава значително, повече от два пъти, от това на контролата за групите CRC3 и подгрупите CRC1₂ и CRC2₁, докато за останалите подгрупи то не се променя съществено (Таблица 3); 3) не се наблюдава отместване на T_m на преходите на HSA и глобулините; 4) последният преход при 82 °C е значително редуциран или не се регистрира при CRC пациентите (Фигура 9). Липсата на този последен преход, приписван на IgG и трансферин, може да е индикатор за силно намаляване на тяхното количество в плазмата на пациенти с колоректален карцином, или за отместването му, което предполага променена стабилност на тези плазмени белтъци.

Таблица 3. Термодинамични параметри (средни стойности и стандартно отклонение), определени от ДСК профилите на CRC и GC подгрупите и контролата. Представени са отношението между топлинните капацитети на T2 и T3 ($c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$); тоталната енталпия (ΔH_{cal}); температурата на първия момент (T_{FM}); средните стойности на метричното разстояние P, коефициента на Пирсън r и метричното сходство ρ.

групи	Фиг.	$c_p^{ex} T_2 / c_p^{ex} T_3$	ΔH_{cal} (cal/g. deg)	T _{FM} (°C)	P	r	ρ
Контрола		2.08±0.29	4.56±0.73	64.7±1.2	-	-	-
Тест контрола					0.797*	0.988*	0.850*
CRC1 ₁	8	1.90±0.23	4.35±0.88	65.3±0.9	0.720	0.981	0.778
CRC1 ₂	8	1.92±0.35	2.90±0.60	66.6±1.1	0.578	0.971	0.658
CRC2 ₁	8	3.90±1.64	3.40±0.43	63.1±0.6	0.715	0.967	0.771
CRC2 ₂	8	12.10±2.50	1.90±0.04	62.1±0.3	0.370	0.854	0.456
CRC3 ₁	8	1.31±0.14	4.19±0.99	67.3±1.0	0.728	0.905	0.768
CRC3 ₂	8	0.69±0.13	4.04±0.44	68.6±0.7	0.630	0.700	0.647
GC1 ₁	9	2.11±0.23	4.02±0.86	66.2±0.4	0.721	0.983	0.779
GC1 ₂	9	1.42±0.11	3.79±0.51	66.1±0.5	0.578	0.971	0.658

*Стойности на допълнителна група от тест-термограми на 8 здрави индивиди, анализирани спрямо референтната група от контролни термограми.

Трябва да се отбележи, че за по-голям брой (75%) от изследваните пациенти със CRC и GC се наблюдава стабилизиране на плазмения протеом (T_{FM} има по-високи

стойности от характерните за контролите), докато за останалите CRC случаи (тези класифицирани в CRC2 калориметричната група) той е дестабилизиран (T_{FM} има по-ниски стойности от тези на контролите). Това показва, че има съществена разлика и специфични промени в белтък-лиганд взаимодействията при CRC пациентите, попадащи в различни калориметрични групи.

Метричното сходство на термограмите от тествани CRC групи спрямо референтната група термограми, варира в следните диапазони $0.370 < P(T) < 0.728$; $0.700 < r < 0.981$; $0.456 < \rho < 0.778$ (Таблица 3). Тези стойности, особено за подгрупата CRC2₂, са значително по-ниски от изчислените за тест контролни термограми (които не са включени в референтната група).

2.7. Дискусия на ДСК класификацията на колоректален карцином и карцином на стомаха

В настоящата работа е представена една различна, термодинамична гледна точка за хетерогенността на CRC, която най-вероятно произтича от комплексния характер на болестта, която на молекулно ниво се изразява в силно модифицирани междумолекулни взаимодействия.

Макар че ДСК данните разкриват хетерогенност в термограмите, трябва да се отбележат някои общи характеристики за мнозинството от CRC плазмените профили: (1) силно изменение на преходите, свързани с албумина и глобулините и (2) липса на преходи във високотемпературната област на ДСК термограмите в сравнение с тези на здрави индивиди. Пациенти, диагностицирани с GC, се характеризират с термограми, подобни на две от CRC подгрупите.

Оказва се, че плазменият протеом на пациенти с еднакъв TNM стадий (TNM класификацията за стадиране на колоректалните тумори се базира на дълбочината на туморната инвазия в чревната стена, броя на обхванатите от метастази регионални лимфни възли и наличието или липсата на далечни метастази) проявяват различно термодинамично поведение и са класифицирани в различни ДСК групи. Например 54.7% от CRC случаите са в T1-4N0M0 стадии, т.е. без метастази и засягане на лимфни възли, но термограмите за тези случаи са разпределени в различни CRC групи, с изключение на подгрупата CRC2₂. Следователно не установихме корелация между TNM стadiите на CRC пациентите и калориметричните групи профили (Таблица 4).

Тези факти са в подкрепа на приложението на ДСК за мониторинг по време на лечение (химиотерапия) или след хирургична интервенция когато TNM стадирането не е приложимо.

Таблица 4. Разпределение на TNM стадите в калориметрично класифицираните CRC подгрупи и CRC термограмите, попадащи в ДСК класификацията.

Подгрупи Стадий	CRC1 ₁	CRC1 ₂	CRC2 ₁	CRC2 ₂	CRC3 ₁	CRC3 ₂
T2N0M0		2				
T3N0M0		2	1		3	
T4N0M0	6	3	1		8	2
T4N1M0	5				4	
T4N0M1	1				1	
T4N1M1	2	2			2	2
T4N2M0						
T4N2M1			1			1
T4N2M2						
След операция	2	3	1	2	9	

Фактът, че термограмите на кръвна плазма от пациенти, подложени на хирургическа интервенция (25%) от 1 до 3 месеца преди ДСК изследването, не се доближават до тези на контролата, а принадлежат към някои CRC калориметрични групи, показва, че плазменият протеом остава засегнат дори след хирургическо премахване на тумора.

Това изследване разкрива специфични изменения на термодинамичното поведение на плазмения протеом на колоректален/стомашен карцином и допринася за утвърждаването на калориметрията като неинвазивен инструмент за диагностика на епителни карциноми. Представените данни обосновават разширяване на калориметричните изследвания с цел да се натрупат повече данни и да се интерпретират наблюдаваните промени в термодинамичните свойства на плазма от онкопациенти.

3. ОБОБЩЕНИЕ

Съвременните високи технологии позволяват нова генерация мащабни изследвания (така наречените „омика” – протеомика, геномика, интерактомика, метаболомика и др.), които се очаква да доведат до по-добро разбиране на природата на раковите заболявания, откриване на нови биомаркери и таргетинг не само на отделни белтъци, но и на мрежата от взаимодействия между тях, както и до персонализирана медицина. Независимо от това, че тези технологии доведоха до по-задълбоченото разбиране на биологията на рака, на диагнозата и прогнозата (класифициране и детайлно стадиране на туморите, и откриване на голям брой белтъчни маркери за няколко канцерогенни заболявания, идентифицирането на много онкогени и тумор-подтискащи гени), те все още не са развили целия си потенциал и не водят до фундаментална промяна в клиничния изход от тези заболявания.

За да се ускори разгадаването на комплексната природа на рака, научните разработки са фокусирани върху прилагане на мултидисциплинарен подход за интегриране на принципите и подходите във физиката към биологията на рака, и в прилагане на нови физични и биофизични методи. Изследванията в настоящата работа следват тази стратегия, а именно прилагането на термодинамиката или на метода диференциална сканираща калориметрия за изследване на протеома на кръвната плазма, която се счита за „изображение” на физиологичното и патологично състояние на всички тъкани в човешкото тяло. Приложеният подход има потенциал за въвеждане в клиничната практика, тъй като е подходящ за бърза детекция и скрининг, изисква малък обем проба и не е инвазивен за пациентите. Освен това кръвна плазма и серум могат да се получават многократно, в различни стадии на дадено заболяване, и по време на различни курсове на терапия.

Представеното детайлно изследване на серумен/плазмен протеом на пациенти с онкозаболявания (епителни тумори на гастро-интестиналния тракт и моноклоналното В-клетъчно нарушение множествен миелом), прилагайки нов термодинамичен подход, показва, че патологични промени в протеома водят до характерни промени в неговото термодинамично поведение. Анализът на кръвни серуми от пациенти, диагностицирани с ММ със секречия на моноклонален имуноглобулин (IgG, IgA, IgM и BJ белтък) и несекреторен миелом, и кръвна плазма от пациенти с CRC и GC разкри специфични промени на термодинамичните характеристики на плазмения/серумния протеом. Това

даде възможност калориметричните профили на MM, CRC и GC да се класифицират в „термодинамични групи” в зависимост от променената температурна стабилност на серумния протеом, наличието на М-белтък, промяната на топлинните капацитети на албумин и глобулини, и нарушеното взаимодействие между серумните белтъци (Todinova et al., 2011, 2012).

Разликите между термодинамичните характеристики на множествен миелом и колоректален/стомашен карцином разкриват потенциала на ДСК метода за разграничаване на злокачествени заболявания с различен произход и локализация. Въпреки че при около 13% от MM със секретирание на М белтъци, 15% със секретирание на ВJ белтък и 22% от случаите на колоректален карцином термограмите не се различават много съществено от тези на контролната група, останалите 87% MM, 85% ВJ MM и 78% CRC случаи се различават драстично, както от контролата така и помежду си. За сравнение, широко наложилният се в практиката молекулярен онкобиомаркер СЕА има специфичност едва около 30%. Повечето от изследваните случаи на колоректален и стомашен карцином, подобно на MM, се характеризират с изменено отношение на топлинния капацитет на преходите, съответстващи на албумина и глобулините. Единствено при CRC2 калориметричната група се установи дестабилизиране на протеома, за разлика от CRC1 и CRC3 и всички изследвани случаи на MM, при които е стабилизирани.

Характерно за случаите на колоректален карцином, карцином на стомаха и множествен миелом са неясно изразените преходи и/или липса на такива във високотемпературната област на термограмите (Todinova et al., 2011, 2012). Например, свързаният с Igs и трансферин преход, наблюдаван при 85 °C (за кръвен серум) и 82 °C (за кръвна плазма) при здрави индивиди се забелязва само в IgG MM случаите при секретирание на много високи концентрации IgG и несекреторен миелом (NS1₂ подгрупа). При други заболявания, като амиотрофична латерална склероза, рак на яйчниците и меланом, в тази температурна област се наблюдава преход или рамо с по-висока стойност на c_p^{ex} от това на здравите контроли (Garbett et al., 2009). Досега само за рак на ендометриума и на маточната шийка е установено, че този преход съвпада с този в здрави групи (Garbett et al., 2009). Тези данни показват, че промените на T_m и c_p^{ex} на този високо-температурен преход могат да служат като показатели на злокачествено заболяване, поне за някои видове рак.

Очевидно, наблюдаваните промени в термодинамичните характеристики се дължат не само на промяна на концентрацията на белтъците с най-високо съдържание в

кръвния серум/плазма, а по-скоро на изменение на тяхната конформация и температурна стабилност в резултат от взаимодействие на пламените белтъци с други белтъци и/или лиганди, които вероятно са все още неидентифицирани маркери на изследваните заболявания.

Интересно е също да се отбележат няколко факта: (1) термодинамичното поведение на плазма от пациенти, които са били подложени на хирургична намеса, запазват характеристиките на колоректален карцином, отразявайки дългосрочни модификации на плазмения протеом; (2) ДСК регистрира драстични промени в кръвен серум от пациенти с несекреторен миелом, за който все още липсват надеждни биомаркери.

Утвърждаването на ДСК като инструмент за диагностика изисква висока специфичност, т.е. способността да се прави разлика както между различни заболявания, така и между онкологични заболявания с различен произход и локализация. Действително, сравняването на ДСК профилите на миелом и колоректален карцином, дискутирано в работата, показва, че те се различават значително. От друга страна сравнението на колоректален карцином и карцином на стомаха, и двата произхождащи от дисплазия на епителната тъкан, но различаващи се по своята локализация, разкриват общи характеристики. Следователно, ДСК потенциалът за диференциация между различни злокачествени заболявания (по отношение на тяхната природа и локализация) е обещаващ, но изисква бъдещи систематични изследвания и потвърждаване.

4. ИЗВОДИ

1. Установени са разлики между термодинамичното поведение на протеома на кръвна плазма/серум от пациенти, диагностицирани с колоректален/стомашен карцином и множествен миелом, и това, характерно за здрави индивиди.
2. Термодинамичните параметри отношение на топлинните капацитети на преходите на албумин и глобулини, и температура на първия момент могат да служат като калориметрични биомаркери за онкологични заболявания.
3. На базата на установените специфични промени на калориметричните профили е представена ДСК класификация на изследваните онкологични заболявания.
4. ДСК е особено подходящ комплементарен метод за диагностика на несекреторен миелом, за който все още не са установени надеждни молекулни маркери.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

1. За пръв път е проведено мащабно изследване на температурно-индуцираното денатуриране на белтъците в човешка кръвна плазма и серум от пациенти, диагностицирани с онкологични и хематологични заболявания с помощта на високо-чувствителна калориметрия. Получена е нова информация за термодинамичното поведение на плазма и серум от пациенти с множествен миелом, колоректален карцином и карцином на стомаха.
2. Установено е, че калориметричните профили на пациенти, диагностицирани с онкологични заболявания, се различават значително от характерните за здрави индивиди и е представена ДСК-базирана класификация за изследваните онкозаболявания.
3. Показано е, че има съществена прилика между групи калориметрични профили за несекреторен миелом, миелом със секреция на Бенс-Джоунс белтъка и малка част от случаите на миелом със секретирание на моноклонални имуноглобулини. За пръв път тези изследвания дават основание да се предположи наличието на друг биомаркер или специфично макромолекулно взаимодействие за различните типове множествен миелом.
4. Калориметричните изследвания върху несекреторен миелом демонстрират, че ДСК е подходящ диагностичен тест за тази неоплазия, чието диагностициране е трудно с рутинните клинични методи.
5. На базата на установените разлики от статистически голям брой ДСК профили на кръвен протеом от пациенти с колоректален карцином, карцином на стомаха и множествен миелом, са получени групи от референтни термограми, т.е. типични калориметрични биомаркери за изследваните заболявания, които в бъдеще могат да намерят приложение за тестване на ново-диагностицирани случаи и скрининг-диагностика.

6. Демонстриран е потенциалът на ДСК като подходящ, неинвазивен метод за разграничаване на злокачествени заболявания с различна природа. Получените резултати допринасят за валидирането на ДСК като нов подход за диагностика на онкозаболявания.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Todinova S., Krumova S., Gartcheva L., Roberst C., Taneva S. G. (2011) Microcalorimetry of blood serum proteome: a modified interaction network in the multiple myeloma case. *Anal. Chem.* 83, 7992–7998
2. Todinova S., Krumova S., Kurtev P., Dimitrov V., Djongov L., Dudunkov Z., Taneva S. G. (2012) Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1879–1885
3. Todinova S., Krumova S., Radoeva R., Gartcheva L., Taneva S.G., Discrimination of the calorimetric fingerprints of multiple myeloma sera with secretion of Bence Jones protein and nonsecretory myeloma (подготвена за публикуване)

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

- 1. IV International congress of molecular medicine**, 27-30 юни 2011, Thermodynamic behavior of blood plasma from patients with colorectal cancer, S. Krumova, S. Todinova, P. Kurtev, V. Dimitrov, Z. Dudunkov, S.G. Taneva - постер
- 2. IX национален конгрес по хематология**, 27-30 октомври 2011, Правец, Микрокалориметрия на кръвен серум от пациенти, диагностицирани с множествен миелом, Л. Гърчева, С. Тодинова, С. Крумова, В. Толев, С. Танева - постер
- 3. Осми национален конгрес по онкология с международно участие**, 10-13 ноември 2011, София, Thermodynamic approach to cancer with different localizations, S. Todinova, S. Krumova, P. Kurtev, V. Dimitrov, L. Djongov, Z. Dodunkov, N. Chureshky, S. Taneva - доклад
- 4. Осми национален конгрес по онкология с международно участие**, 10-13 ноември 2011, София, Multiple myeloma related modification of the thermal stability of blood serum proteins, S. Todinova, S. Krumova, L. Gartcheva, V. Tolev, C. Robeerst, S. Taneva - постер
- 5. XVII ISBC конференция**, 2-7 June 2012, Лайпциг, Германия, Multiple myeloma related modifications of the thermal stability of blood serum proteins, S. Krumova, S. Todinova, L. Gartcheva, S. Taneva - постер

ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ

Todinova S., Krumova S., Gartcheva L., Robeerst C., Taneva S.G. (2011) Microcalorimetry of Blood Serum Proteome: A Modified Interaction Network in the Multiple Myeloma Case. *Analytical Chemistry* 83, 7992–7998

1. Sun Z., Yanling Z., Tiantian L. et al. (2013) Spectrum-effect relationships between UPLC fingerprints and bioactivities of five Aconitum L. Plants. *Thermochim. Acta* 558, 61–66

2. Johnson, C. M. (2013) Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability, *Arch. of Biochem. Biophys* 531, 100–109

3. Garbett N., Merchant M., Chaires J. (2013) Calorimetric analysis of the plasma proteome: Identification of type 1 diabetes patients with early renal function decline. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4675–4680

Todinova S., Krumova S., Kurtev P., Dimitrov V., Djongov L., Dudunkov Z., Taneva S. G. (2012) Calorimetry-based profiling of blood plasma from colorectal cancer patients. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1879–1885

1. Synytsya A., Judexová M., Hrubý T., Tatarkovič M., Miškovičová M., Petruželka L., Setnička V. (2013) Analysis of human blood plasma and hen egg white by chiroptical spectroscopic methods (ECD, VCD, ROA). *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 5441–5453

2. Garbett N., Merchant M., Chaires J., Klein J. (2013) Calorimetric analysis of the plasma proteome: Identification of type 1 diabetes patients with early renal function decline. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4675–4680