



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

**ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО
ИНЖЕНЕРСТВО**

СЕКЦИЯ „БИОМАКРОМОЛЕКУЛИ И БИОМОЛЕКУЛНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ”

АВГУСТИНА КРАСИМИРОВА ДАНАИЛОВА

**„Калориметрични маркери за диагностика
и мониториране на онкохематологични
заболявания”**

Автореферат

на дисертация представена за присъждане на образователна и научна степен „доктор”

Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”,

Професионално направление: „Биологически науки”, Научна специалност: „Биофизика”

Научни ръководители: *проф. Стефка Германова Танева, дбн
доц. д-р Сашка Бойчова Крумова*

София, 2017

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен семинар на секция „Биомакромолекули и биомолекулни взаимодействия“ на ИБФБМИ – БАН, проведен на 04.12.2017 г.

Дисертационният труд съдържа 133 страници, в които са включени текст, 68 фигури и 30 таблици. Цитирани са 128 литературни източници. Основните резултати от дисертацията са публикувани в 3 научни публикации.

Защитата на дисертацията ще се състои на 2018 г. от часа в залата на Института по Физиология на растенията и генетика – БАН, София, 1113, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 21, ет. 2. Материалите, свързани със защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИБФБМИ – БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл.105, София.

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
**ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО
ИНЖЕНЕРСТВО**
СЕКЦИЯ „БИОМАКРОМОЛЕКУЛИ И БИОМОЛЕКУЛНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ”

АВГУСТИНА КРАСИМИРОВА ДАНАИЛОВА

**„Калориметрични маркери за диагностика
и мониториране на онкохематологични
заболявания”**

Автореферат

на дисертация представена за присъждане на образователна и научна степен „доктор”
Област на висше образование: „Природни науки, математика и информатика”,
Професионално направление: „Биологически науки”, Научна специалност: „Биофизика”

Научни ръководители: *проф. Стефка Германова Танева, дбн
доц. д-р Сашка Бойчова Крумова*

София, 2017

Използвани съкращения

АТСК – автоложна трансплантация на хемопоеични стволови клетки

ДСК – диференциална сканираща калориметрия

ММ – мултиплен миелом

ВJ – Бенс Джоунс протеин

c_p^{ex} – специфичен топлинен капацитет

c_p^{HSA} – специфичен топлинен капацитет на албумин

c_p^{Igs} – специфичен топлинен капацитет на имуноглобулини

F_{ag} – антиген-свързващ фрагмент

F_c – кристализиращ фрагмент

FLC – свободни леки вериги

HLC – тежки/леки вериги

HSA – човешки серумен албумин

Ig(s) – имуноглобулин(и)

MGUS – Моноклонална гамопатия с неопределено значение

m_p – точка на мониториране

NAD(P)H – редуциран никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат

NS MM – несекреторен мултиплен миелом

P – метрично разстояние

r – коефициент на корелация по Пиърсън

ρ – метрично сходство

T_{FM} – среден център на тежестта на термограмата

T_m – температура на денатурационен преход

T_m^{mp} – температура на основния денатурационен преход в термограмата на кръвен серум

T_m^{HSA} – температура на денатурация на албумин

T_m^{Igs} – температура на денатурация на имуноглобулини

WM – Валденщрьом макроглобулинемия

$\beta 2m$ – β -2 микроглобулин

ΔH – енталпия на денатурация

$^L Igs_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани със секреторен миелом/WM, мониториращи по време на лечение, s – изотип на моноклоналния имуноглобулин (A, G или M), p – пациент, n – пореден случай

$^T IgS_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани със секреторен миелом/WM, селектирани и/или подложени на ATCK, s – изотип на моноклоналния имуноглобулин (A, G или M), p – пациент, n – пореден случай

$^L NS_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани с несекреторен миелом, мониториращи по време на лечение, p – пациент, n – пореден случай

$^T NS_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани с несекреторен миелом, селектирани и/или подложени на ATCK, p – пациент, n – пореден случай

$^L FLC_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани с BJ MM, мониториращи по време на лечението им, p – пациент, n – пореден случай

$^T FLC_{pn}$ – означение за пациенти диагностицирани с BJ MM, селектирани и/или подложени на ATCK, p – пациент, n – пореден случай

ВЪВЕДЕНИЕ

Разработването на нови методи за диагностика и мониториране на заболявания, и намирането на подходящи способи за индивидуализирана терапия са предизвикателства, които продължават да стоят пред съвременната медицина.

Голяма част от съвременните изследвания са насочени към характеризирание на кръвния протеом, който съдържа безценно богатство от биомаркери, отразяващи физиологичното състояние на всички тъкани. Така структурните и функционални характеристики на различните плазмени протеини, и техни модифицирани форми, са отражение на моментните физиологични и патологични състояния в организма. Счита се, че дефинирането на специфични биомаркери ще доведе до клинично приложение на персонализираната протеомика, но до момента едва няколко теста за детекцията на биомаркери намират практическо приложение (Calvo et al., 2005; Chaires, 2009; Raab et al., 2009; Honda et al., 2013). Усилията са насочени главно към изследването на фракцията на минорните плазмени протеини/пептиди, а взаимодействията им с основните плазмени протеини остават недобре проучени. През последните 10 години диференциалната сканираща калориметрия (ДСК) се прилага успешно за характеризирание на термодинамичните свойства на основните плазмени/серумни протеини в норма и патология, които силно зависят и от взаимодействията им с ниско-молекулни форми (лиганди, потенциални биомаркери).

ДСК проследява температурно-индуцираните конформационни преходи на биомолекули в разтвор. В случая на сложни биологични флуиди като кръвна плазма/серум обаче в разтвора присъстват множество биомолекули, чиито калориметрични преходи се припокриват и водят до регистрирането на комплексни ДСК профили (термограми). Приложението на ДСК като диагностичен инструмент за анализ на кръвна плазма/серум, бе иницирано с пилотната работа на Chaires и съавтори (2007). Чрез проследяване на топлинното денатуриране на протеините на кръвната плазма беше установен типичен термодинамичен профил за здрави индивиди и значително модифицирани термограми за пациенти с различни

заболявания. Неотдавна методът беше приложен и за изследване на протеома на цереброспинална течност и тъкани от мозъчни тумори (Chagovetz et al., 2013). Така се натрупват все повече доказателства за това, че характерните за дадено заболяване калориметрични профили могат да бъдат използвани като био – калориметрични) маркери за диагностиката му.

ДСК подходът беше приложен и за изследване на кръвен протеом от пациенти, диагностицирани с една от най-често срещаните хематологични неоплазии - мултиплен миелом (ММ). ММ е свързан с пролиферацията на злокачествени плазмоцити в костния мозък и е съпроводен със секретирането на моноклонални (М) имуноглобулини (Igs) (парапротеини, изотипове IgG, IgA, IgM, IgE и IgD), моноклонални леки вериги (протеина Бенс Джоунс, (BJ)), или протича с липса на секреция на парапротеини в кръвния поток – несекреторен миелом (NS ММ). Наблюдаваните калориметрични преходи в термограмите на здрави индивиди и на ММ пациенти са приписани на основните плазмени белтъци (албумин, имуноглобулини, трансферин) и моноклонални имуноглобулини (парапротеини) (Todinova et al., 2011, 2014).

Беше установено, че кръвният серум от пациенти с ММ не се характеризира с един типичен термодинамичен профил, а с набор от калориметрични профили (групи), в зависимост от присъствието и концентрацията на моноклонални парапротеини и техния изотип. Въз основа на тези данни беше разработена калориметрична класификация на ММ. Установеното разнообразие от калориметрични групи, характеризиращи ММ, вероятно е породено от хетерогенната природа (на генетично и молекулно ниво) на това заболяване (Todinova et al., 2011, 2014).

Важен етап от лечението на много пациенти с ММ, левкимия и други лимфоми е автоложната трансплантация на стволови клетки (АТСК), тъй като удължава преживяемостта и подобрява качеството на живот на пациентите. Въпреки това повечето пациенти (около 85 %) в даден етап показват рецидив/прогресия на заболяването, а само при 15 % се наблюдава пълна ремисия (по данни за период на мониториране от две години, Jimenez-Zepeda et al., 2014). Установено е, че пациентите с ранен

рецидив след АТСК имат по-лоши прогнози за оцеляване и появата на рецидив се счита за главен прогностичен маркер при ММ.

В настоящия дисертационен труд си поставихме за цел да разработим нов, неинвазивен, ДСК-базиран подход за оценка на клиничния статус и мониториране на пациенти с онкохематологичното заболяване мултиплен миелом (различен секреторен изотип, несекреторен и ММ със секреция на свободни леки вериги) и Валденщрьом макроглобулинемия, подложени на АТСК и на нетрансплантирани пациенти по време на лечението им.

Резултатите от дисертационния труд разкриха потенциала на ДСК подхода за класифициране на термограми на пациенти с IgM гамопатии и за регулярно мониториране на ММ пациенти в хода на лечението им, идентифициране на периоди на ремисия и повторна поява на заболяването, и възможността за приложението му в клиничната практика като комплементарен биоаналитичен подход за мониториране на пациенти с онкохематологични заболявания в хода на тяхното лечение.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛИ

Дисертационният труд цели разработването на нов неинвазивен подход и дефинирането на калориметрични маркери за диагностика, мониториране и оценка на клиничния статус на пациенти с мултиплен миелом и Валденщрьом макроглобулинемия, подложени на автоложна трансплантация на стволови клетки и нетрансплантирани пациенти по време на лечението им.

ЗАДАЧИ

За постигането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Да се изследва калориметричното поведение на кръвни серуми от пациенти с ММ и Валденщрьом макроглобулинемия и да се търси корелация между калориметричните и имунологичните параметри.

2. Да се изследва калориметричното поведение на кръвни серуми от пациенти с ММ по време на лечението им преди и след АТСК, и да се оцени потенциала на ДСК подхода за обективна оценка на ефекта на АТСК.
3. Да се сравни динамиката на промените в калориметричните параметри при трансплантирани и нетрансплантирани пациенти, диагностицирани с ММ, с тази на промените в традиционното прилагане в клиничната практика имунологични маркери.
4. Да се тестват възможностите на флуоресценцията на серумния NAD(P)H като индикатор за метаболитна дисфункция при ММ. Да се сравнят промените във флуоресценцията на NAD(P)H с данните от имунологичните и калориметрични тестове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Кръвен серум

Кръвни серуми от пациенти, диагностицирани с ММ и WM, бяха получени от Националната специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания (НСБАЛХЗ), София. Изследването беше одобрено от комисията по етика на НСБАЛХЗ. Всички участващи в изследването пациенти подписаха информирано съгласие.

Пробите от кръвен серум от здрави доброволци и пациенти, диагностицирани с ММ и WM, са подготвени чрез 15 мин. центрофугиране на кръв при 900 RCF в BD Vacutainer SST/ 5 мл епруветки. Супернатантата (кръвен серум) беше разредена 8-кратно в PBS буфер, рН 7.2, за ДСК анализ и флуоресцентни измервания. Количеството тотален белтък беше определено по Биуретов метод (Ryan & Chopra, 1976).

2. Диференциална сканираща калориметрия

ДСК е биофизичен метод за термичен анализ на биологични системи, какъвто е и кръвния серум. Измененията в термодинамичното поведение на основните серумни протеини в кръвен серум на здрави индивиди и пациенти е изследвано с помощта на високо-чувствителен микрокалориметър ДАСМ-4 (разработен от Привалов). Бяха определени следните калориметрични параметри – температура на денатурация (T_m) и

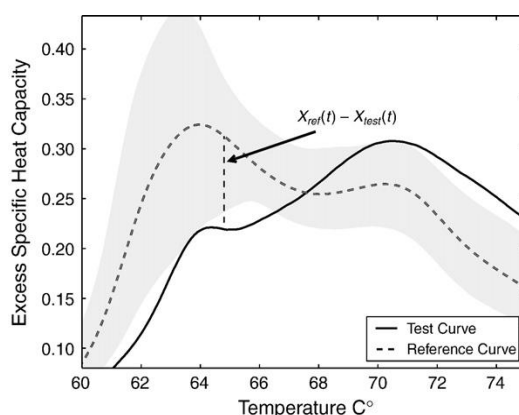
специфичен топлинен капацитет на температурно-индуцираните преходи (c_p^{ex}), енталпия на денатурация (ΔH), представляваща площта под интегрираната крива, среден център на тежестта на термограма (T_{FM}):

$$T_{FM} = \frac{\int_{T_1}^{T_2} T c_p dT}{\int_{T_1}^{T_2} c_p dT} \quad (1)$$

където T_1 и T_2 са температурите в началото и края на прехода (Michnik et al. 2009).

2.1. Статистически анализ на термограми от кръвен серум

За анализ на получените резултати е приложен разработеният от Fish и съавт. алгоритъм за анализ и класифициране на ДСК профили (Fish et al., 2010). Анализът на една тест-термограма включва сравнение с референтни термограми (Фиг. 1).



Фиг. 1. Сравнение на тест-термограма $X_{test}(T)$ (непрекъсната линия) с референтна $X_{ref}(T)$ термограма (пунктирна линия) (Fish et al. 2010).

Определят се два параметъра – метрично разстояние (P) и коефициент на корелация (r), комбинацията между които представлява "метрично сходство" (ρ), което може да се използва за класифициране на неидентифицирани термограми спрямо дадена референтна група. Параметърът P може да се тълкува като вероятност, определена от стандартизиране на многовариантно разстояние между тест-кривата и

референтната термограма. Стойност на P близо до единица показва, че тест-кривата е по-близка до референтната, докато стойност на P под единица показва, че тест-кривата се различава съществено от референтната.

Метричното сходство (ρ) се описва от следната връзка между P и r :

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

където w е тежестта на P и r , и $0 \leq w \leq 2$. Когато стойността на ρ е близка до 0 сходството между двете криви е малко, а при стойности близки до 1 – обратно тест кривата е много близка до референтната.

За да бъде проверено дали експериментално регистрираните термограми на серуми от ММ пациенти са статистически различни от контролната група от термодинамични профили беше проведен и непараметричен статистически тест по Wilcoxon (Origin 8.1). Бяха характеризирани два температурни региона, съответстващи на денатурацията на албумина (55 – 65 °C) и имуноглобулините (65 – 80 °C) в термограмите на кръвен серум от здрави индивиди. Те се означават като регион на албумина и регион на имуноглобулините, съответно. Статистическият параметър W беше определен за всяка двойка термограми и при $W < 0.05$ термограмите бяха считани за статистически различни.

3. NAD(P)H флуоресценция

NAD(P)H е основен флуорофор в кръвния серум, като намаляването на интензитета на NAD(P)H флуоресценцията се свързва с метаболитна дисфункция, типична за раковите заболявания (Mikirova et al., 2003; Danailova et al., 2015).

За детекция на флуоресценцията на NAD(P)H беше използван спектрофлуориметър Jobin–Yvon JY3. Флуоресцентните спектри бяха регистрирани в диапазона 370 – 570 нм, при възбуждане с дължина на вълната 340 нм и използвайки 10 нм процепи. Преди детекцията на флуоресцентните спектри, серумът беше разреден 33 пъти в PBS буфер (pH7.2). Регистрираните флуоресцентни спектри бяха коригирани за фонова

емисия като от всеки от тях беше изваден спектъра на буфера. Беше проведен статистически анализ на данните чрез прилагането на Student's t-тест.

4. Капилярна електрофореза

Всички пациенти с MM и WM бяха изследвани за наличие на M протеин в кръвния серум и нивата на албумин, α -, α 2-, β 1-, β 2- и γ -глобулини и парапротеини бяха определени с капилярна електрофореза (MINICAP Sebia), която позволява сепарирането на серумните протеини според отношението между техните размер и заряд в капилярни тръбички (O'Connell et al., 2005).

5. Имунологични тестове

В настоящата работа използвахме данните от конвенционални имунологични тестове – Heavylite test и Freelite test.

Heavylite test

Количественото определяне на имуноглобулиновите тежки/леки вериги, както и тяхното отношение (rHLC), разлика (dHLC) и сума (sHLC) беше осъществено чрез "IgM Hevylite имуноанализ" (Binding Site, UK) в НСБАЛХЗ, София.

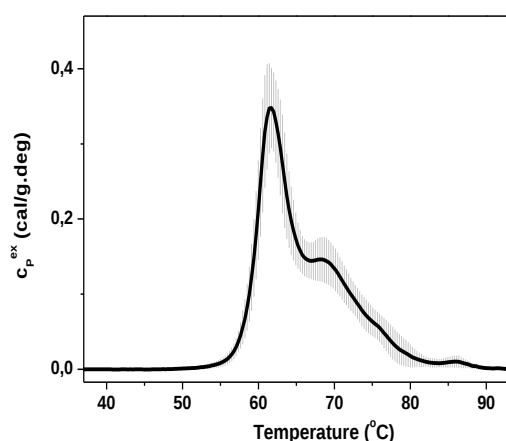
Freelite test

Концентрацията на свободните леки вериги беше определена с помощта на Freelite test (Binding Site UK), проведен със SPAPLUS анализатор в НСБАЛХЗ, София. Количественият анализ на свободните леки имуноглобулинови вериги се състои в определяне на нивата на свободните κ и λ вериги в кръвния серум и тяхното отношение (rFLC).

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Термодинамичен анализ и термодинамични параметри на серумен протеом от здрави индивиди

Измерените термограми от кръвен серум на 21 здрави доброволци (контроли) показват типичен термодинамичен профил (Фиг. 2). От получените термограми бяха определени характерните за контролите стойности на следните калориметрични параметри – температура на преходите на денатуриране на албумин ($T_m^{\text{HSA}} = 62 \pm 0,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$) и имуноглобулини ($T_m^{\text{Igs}} = 68 \pm 0,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$); техните специфични топлинни капацитети ($c_p^{\text{HSA}} = 0.37 \pm 0.05$ и $c_p^{\text{Igs}} = 0.15 \pm 0.05$, съответно) и бяха пресметнати стойностите на отношението $c_p^{\text{HSA}}/c_p^{\text{Igs}}$ (2.56 ± 0.72); средния център на тежестта на термограмата ($T_{\text{FM}} = 64 \pm 1.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) и енталпията на денатурация ($\Delta H = 3.13 \pm 0.34 \text{ cal/g}$). Тези данни са в съответствие с данните представени от Todinova et al. (2011, 2014) за кръвен серум на здрави индивиди, както и с получените от Garbett et al., 2008, 2009 резултати за кръвна плазма.



Фиг. 2. Усреднена термограма регистрирана за кръвен серум на здрави индивиди (контроли) (плътна черна линия), стандартно отклонение (сива сянка).

Проведеният статистически анализ с помощта на алгоритъма на Fish et al. (2010) позволи да бъдат определени референтните стойности за сходството във формата и отстоянието на термограмите, и метричното сходство за здрави индивиди ($r = 0.98$, $P = 0.76$ и $\rho = 0.85$, съответно).

2. Термодинамичен анализ на серумен протеом от пациенти, диагностицирани с мултиплен миелом със секреция на IgM и Валденщрьом макроглобулинемия

2.1. Класифициране на термограмите на серумния протеом на пациентите според подбрани термодинамични характеристики

ДСК бе приложена за изследване на кръвен серум от пациенти с IgM-гамопатии и бяха определени следните параметри: температура на денатурация на албумина (T_m^{HSA}), температура на денатурация на имуноглобулините (T_m^{Igs}), специфичен топлинен капацитет на албумина (c_p^{HSA}), специфичен топлинен капацитет на имуноглобулините (c_p^{Igs}), отношение на специфичните топлинни капацитети на албумина и имуноглобулините (c_p^{HSA}/c_p^{Igs}), енталпия на денатурация (ΔH), среден център на тежестта на термограмата (T_{FM}), както и статистическите параметри коефициент на корелация (r), метрично разстояние (P) и метрично сходство (ρ). Имунологичните характеристики на изследваните пациенти са представени на Таблица 1.

Термограмите на пациентите бяха разпределени в три калориметрични групи на базата на сходството във формата (r) и на отношението c_p^{HSA}/c_p^{Igs} (Фиг. 3). Група IgM1 обхваща ДСК-профили с отношение $c_p^{HSA}/c_p^{Igs} > 1$. Профилите в тази група се разделят на две подгрупи, които се различават по стойностите на c_p^{HSA} – по-високи за подгрупа IgM1₁ ($c_p^{HSA} = 0.25$) в сравнение с подгрупа IgM1₂ ($c_p^{HSA} = 0.20$). Отношението c_p^{HSA}/c_p^{Igs} е под 1 в IgM2 групата. Отново бяха разграничени две подгрупи – IgM2₁, характеризираща се с по-високи стойности на c_p^{HSA} и c_p^{Igs} в сравнение с IgM2₂, за калориметрична група IgM2. Специфична за IgM2₂ подгрупата е появата на нов преход при 58 °C и отместване на последния високотемпературен преход от 86 °C при здравите към 89 °C при MM пациентите. За сравнение при IgM1₁-подгрупата тези преходи са отместени само с 1 °C в сравнение с контролите. IgM3 групата се характеризира с висока кооперативност и основен преход центриран при 73 °C. 29 % от

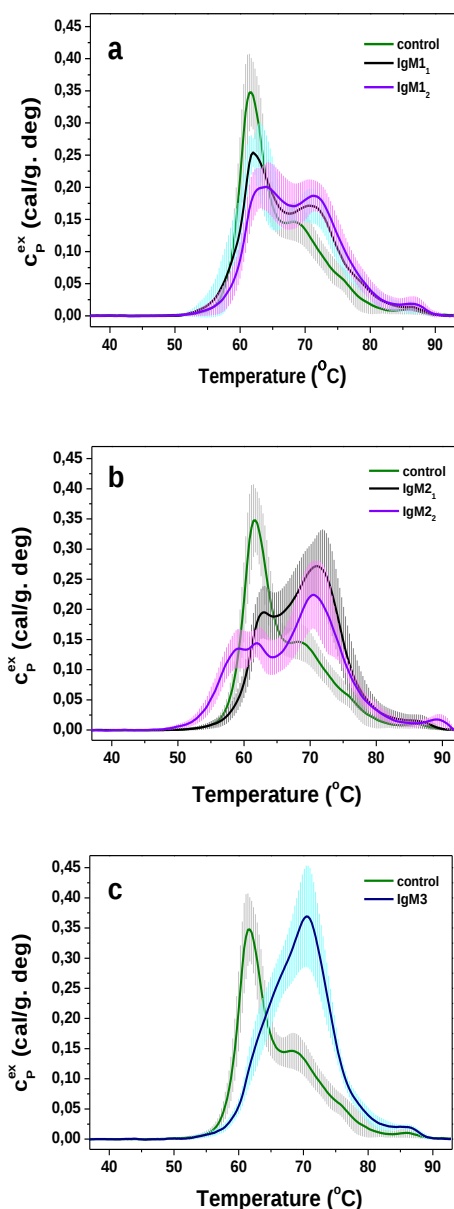
всички изследвани случаи (разпределени в различни групи) нямат преход при 86 °C.

Таблица 1. Характеристики на калориметричните: брой IgM-MM и WM случаи, включени във всяка група/подгрупа, процентно съдържание на М протеин, албумин, β 1-глобулини (средни стойности и стандартни отклонения), интервали, в които се променят стойностите на β 2-микроглобулин (β 2м) и dHLC.

ДСК група	Брой и тип случаи	IgM (%)*	Албумин (%)*	β 1-глобулини (%)*	β 2-микроглобулин (мг/л)	dHLC (мг/мл)
Контроли	21	–	60.9 $\pm$ 5.1	5.95 $\pm$ 1.8	1.0 $\div$ 2.4	0.07 $\div$ 0.62
IgM1 ₁	1 IgM-MM 14 MW	16.1 $\pm$ 12.3	54.5 $\pm$ 7.9	5.1 $\pm$ 0.8	2.6 $\div$ 4.1	1.80 $\div$ 52
IgM1 ₂	10 IgM-MM 14 MW	11.8 $\pm$ 4.4	57.3 $\pm$ 4.7	5.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\div$ 3.4	0.85 $\div$ 22
IgM2 ₁	18 IgM-MM 32 MW	31.1 $\pm$ 6.9	42.1 $\pm$ 7.9	3.9 $\pm$ 0.7	2.4 $\div$ 6.8	1.80 $\div$ 100
IgM2 ₂	3 IgM-MM 4 MW	21.7 $\pm$ 7.3	52.3 $\pm$ 4.9	4.5 $\pm$ 0.6	2.0 $\div$ 4.0	15.0 $\div$ 76
IgM3	7 IgM-MM 4 MW	33.2 $\pm$ 10.6	38.4 $\pm$ 6.3	3.9 $\pm$ 0.8	2.7 $\div$ 4.5	8.3 $\div$ 144

В калориметричните групи дефинирани за IgM MM и WM се наблюдават 4 тенденции:

- отместване на прехода на глобулините към по-високи температури (T_m^{Igs} варира от 68 до 73 °C, за разлика от контролите, при които този преход се появява при 68.1 – 68.7 °C);
- намаляване на амплитудата на прехода на албумина за IgM1 и IgM2 групите, и пълното му изчезване за IgM3 групата;
- понижаване на отношението c_p^{HSA}/c_p^{Igs} в сравнение с това на контролите;
- повишаване на стойностите на T_{FM} в сравнение с тези на контролите.

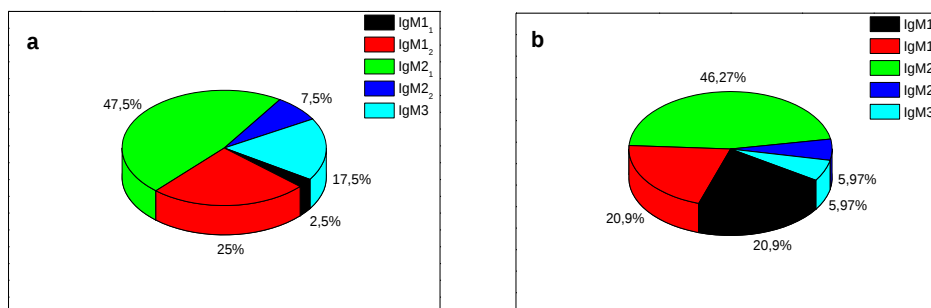


Фиг. 3. Групи и подгрупи от калориметрични профили на пациенти, класифицирани на базата на стойностите на c_p^{HSA} и $c_p^{HSA}/c_p^{Igs.}$, IgM1₁ – черна линия, синя сянка, IgM1₂ – лилава линия, розова сянка (a), IgM2₁ – черна линия, синя сянка, IgM2₂ – лилава линия, розова сянка (b), IgM3 – тъмно синя линия, светло синя сянка (c).

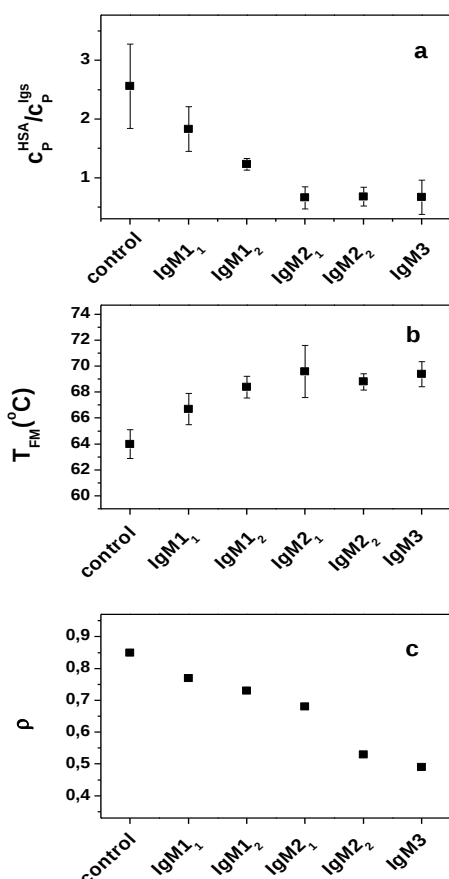
Калориметричните профили за IgM-MM и WM случаите са сходни, поради което дефинираните калориметрични групи и подгрупи включват случаи на двете IgM гамопатии. Разпределението на случаите в рамките на всяка група и подгрупа е показано на Фиг. 4.

В IgM1₁ групата е представен най-малък дял (едва 2.5 % от изследваните случаи) от IgM MM пациентите. 25 % от пациентите със същата диагноза сформират групата IgM1₂, последвана от групата, съдържаща най-голям от общия брой пациенти (47.5 %) – група IgM2₁. В IgM2₂ и IgM3 групите са разпределени останалите случаи на IgM MM – 7.5 % и 17.5 %, съответно (Фиг. 4 a).

Най-голям дял от пациентите с WM са класифицирани в калориметричната група IgM2₁ – 46.3 % от общия брой WM случаи. Останалите WM-пациенти са разпределени между калориметричните групи и подгрупи както следва: IgM1₁ – 20.9 %, IgM1₂ – 20.9 %, IgM2₂ – 5.97 % и IgM3 – 5.97 % (Фиг. 4 b).



Фиг. 4. Разпределение на калориметричните групи и подгрупи за IgM-MM (a) и WM (b) случаите, представени като проценти от общия брой изследвани пациенти. Най-голям дял от пациентите с WM са класифицирани в калориметричната група IgM2₁ – 46.3 % от общия брой WM случаи. Останалите WM-пациенти са разпределени между калориметричните групи и подгрупи както следва: IgM1₁ – 20.9 %, IgM1₂ – 20.9 %, IgM2₂ – 5.97 % и IgM3 – 5.97 % (Фиг. 3 b).



Фиг. 5. Термодинамични и статистически параметри, характеризиращи отделните калориметрични групи и подгрупи дефинирани за IgM MM и WM пациенти: отношение C_p^{HSA}/C_p^{Igs} (a), T_{FM} (b) (средни стойности и стандартно отклонение), статистически параметър ρ (c).

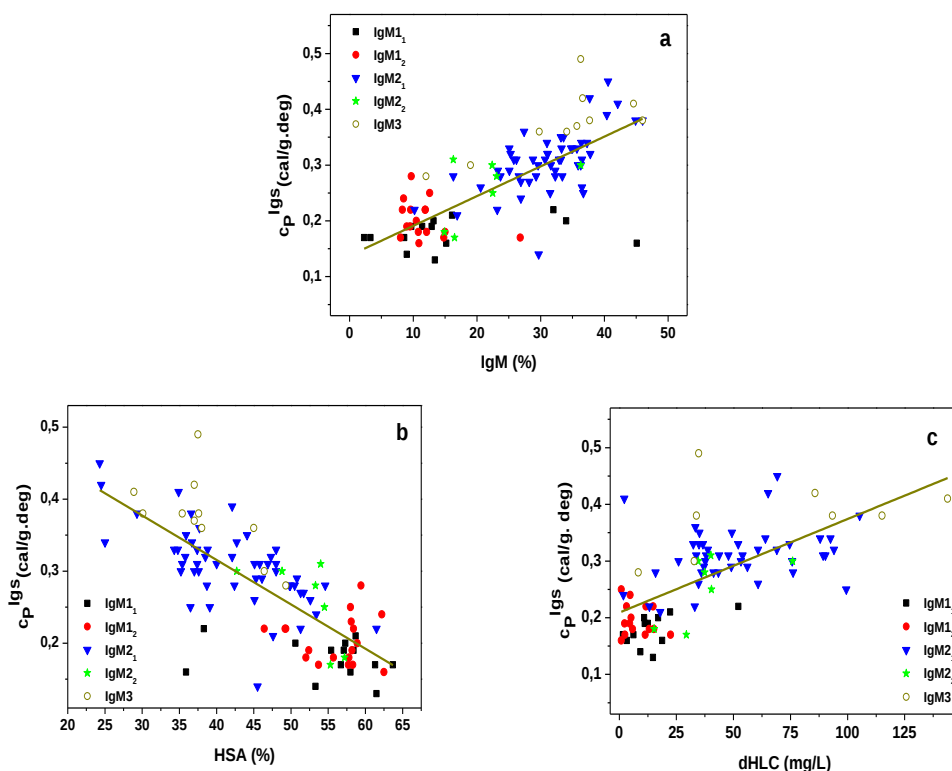
Понижаването на отношението C_p^{HSA}/C_p^{Igs} между групите е свързано с по-висока стойност на T_{FM} и по-ниско ρ (Фиг. 5 b и c).

Статистическият параметър ρ беше определен за всяка от калориметричните групи и подгрупи и сравнен с този, определен за контролни термограми (Фиг. 5 c). Ниските стойности на ρ (под 0.71) говорят за съществено различие между тест-термограмите на пациентите и контролния термодинамичен профил.

C_p^{HSA}/C_p^{Igs} и T_{FM} остават непроменени за групите IgM2 и IgM3 и те са класифицирани като самостоятелни групи на базата на стойностите на ρ .

2.2. Корелация между имунологичните характеристики и термодинамичните параметри за дефинираните калориметрични групи от термограми

Анализирането на имунологичните параметри за пациентите стратифицирани в различни групи/подгрупи на базата на прилики в термограмите им показва следните зависимости: средната концентрация на М протеина е по-висока, докато нивата на албумина и β 1-глобулините са по-ниски за групите IgM2 и IgM3 в сравнение с IgM1 групата; концентрацията на α 1-, α 2- и β 2-глобулините е в границите на референтните стойности за всички изследвани пациенти; dHLC варира в широк интервал в рамките на всяка подгрупа, като най-високата е стойност на този параметър за IgM1 групата е 52 мг/л, докато при групите IgM2 и IgM3 dHLC $\geq$ 100 мг/л (Таблица 1).



Фиг. 6. Зависимост на специфичния топлинен капацитет на температурния преход на глобулините (c_p^{IgS}) от концентрацията на М протеина (% от тоталния протеин) (а), албумина (b) и стойността на параметъра dHLC (c). Данните за всяка група/подгрупа са представени с различни символи (легендите във всеки от панелите) и линеен фит от всички данни. Правите линии представляват линейни фитвания от всички данни. Коефициентът на корелация, изчислен за фитването е: $r = 0.73$ (a), $r = -0.77$ (b) и $r = 0.66$ (c).

От Фиг. 6 става ясно, че c_p^{Igs} зависи силно от процентната концентрация на М протеина и албумина, и по-слабо от стойностите на dHLC. Редуцирането на концентрацията на албумина в серума е по-малко от намаляването на стойността на c_p^{HSA} . Това е индикация, че голяма фракция от молекулите на албумина е стабилизирана, вероятно от свързването с лиганди, което предизвиква отместване на прехода към по-високи температури. Повишаването на c_p^{Igs} не се дължи само на увеличаването на процентното съдържание на М протеин в серума, но и на отместването на прехода на албумина към по-високи температури и припокриването му с T_m^{Igs} .

3. Мониториране на пациенти с мултиплен миелом по време на лечението им

Бяха проследени пациенти с WM и различни изотипове секреторен мултиплен миелом (IgA, IgG и IgM), FLC MM и NS MM по време на тяхното

Таблица 2. Клинични характеристики на изучаваните случаи на секреторен MM и WM. Диагнозата на MM пациентите е базирана на Интернационалната система на стадиране (ISS). Терапевтични схеми: 1. индукционна терапия според институционалния протокол за MM пациенти – протеазомни инхибитори+лъчетерапия+кортикостероиди; 2. индукционна терапия според институционалния протокол за WM пациенти – кортикостероиди и мелфалан.

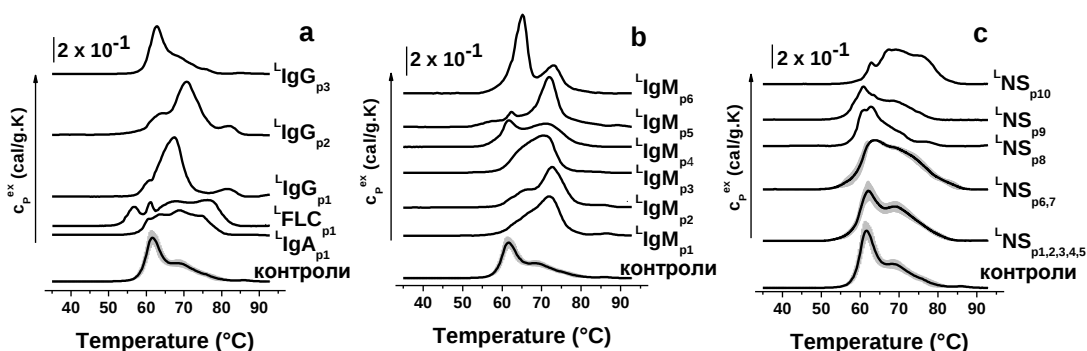
Случай	Диагноза	Терапия	Съпътстващи заболявания
$^L IgG_{p1}$	IgG κ MM, ISS-I	1	Артериална хипертензия, хиперплазия на простатата, тромбофлебит
$^L IgG_{p2}$	IgG λ MM, ISS-III	1	Артериална хипертензия, камъни в бъбреците
$^L IgG_{p3}$	IgG λ MM, ISS-III	1	Артериална хипертензия
$^L IgM_{p1}$	IgM κ WM	2	Ревматизъм, артериална хипертензия
$^L IgM_{p2}$	IgM κ MM, ISS-III	1	Стоматит
$^L IgM_{p3}$	IgM κ WM	2	Хронична обструктивна белодробна болест, артериална хипертензия, хроничен хепатит
$^L IgM_{p4}$	IgM λ WM	2	Малабсорбционен синдром, дистрофия на Зудек
$^L IgM_{p5}$	IgM κ MM, ISS-III	1	Полиневропатия, хроничен дуоденит и гастрит
$^L IgM_{p6}$	IgM κ WM	2	Атрофичен гастрит
$^L IgA_{p1}$	IgA κ MM, ISS-III	1	Артериална хипертензия

лечение и изменението на калориметричните характеристики на кръвния серум на пациентите беше сравнено с това на първичните имунологични маркери – концентрация на М протеина в серума и отношението rFLC. Клиничните характеристики на пациентите са представени в Таблица 2.

3.1. Мониториране на пациенти със секреторен мултиплен миелом и Валденщрьом макроглобулинемия по време на лечението им

Състоянието на всеки пациент беше проследено в продължение на 5 – 20 месеца. Във всяка серия от калориметрични профили са включени 4 – 13 точки на мониториране.

В началото на периода на мониториране калориметричните профили на по-голямата част от пациентите се отклоняват драстично от типичните за здрави индивиди и попадат в различни калориметрични групи, дефинирани в предишни изследвания (Todinova et al., 2011; Krumova et al., 2015), с изключение на един от случаите на IgG MM ($^L\text{IgG}_{p3}$), който демонстрира прилики с контролните термограми (Фиг. 7).



Фиг. 7. Калориметрични профили на кръвен серум от пациенти с WM и MM със секрция на IgG, IgA моноклонални имуноглобулини и моноклонални FLC (a), моноклонален IgM (b) и NS MM (c).

Общи характеристики на калориметричните профили на всички изследвани пациенти (с изключение на $^L\text{IgG}_{p3}$ и $^L\text{IgM}_{p6}$) са силно редуцираният C_p на температурния преход на албумина, центриран при около 60 – 63 °C, в сравнение с контролите и повишаване на C_p на прехода

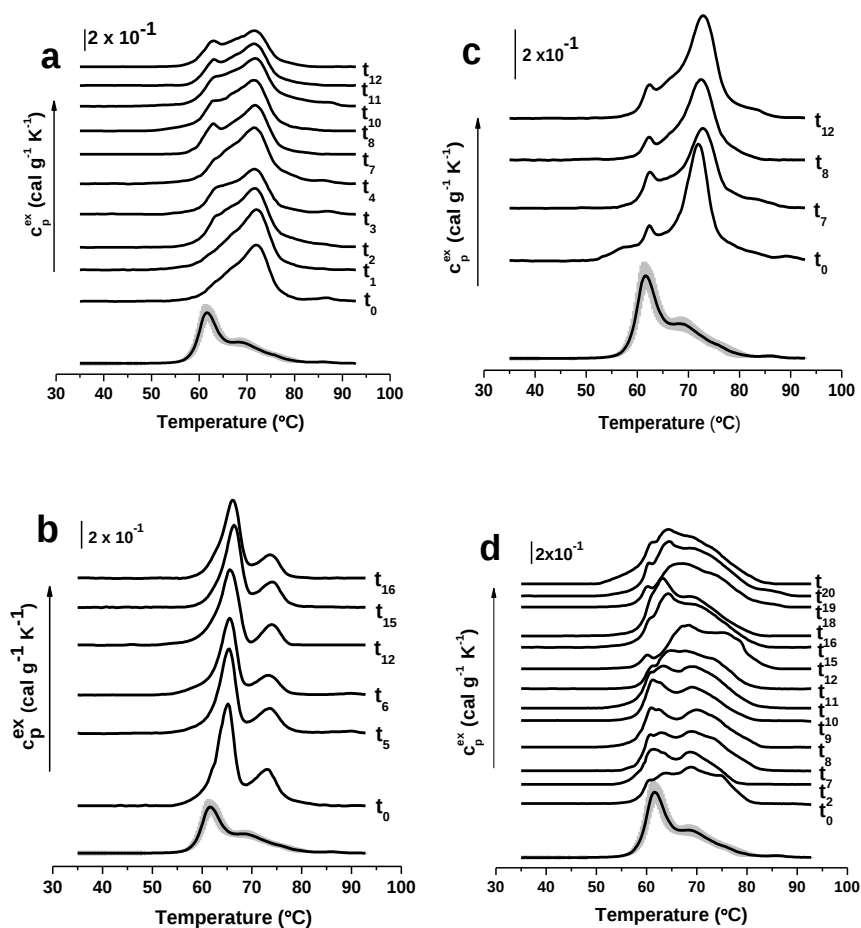
при около 70 °С, приписван на имуноглобулините. Като следствие, за всички термограми калориметричният параметър T_{FM} (64.0 ± 1.1 °С при контролите) и статистическите параметри r , P и ρ (съответно 0.97, 0.76 и 0.85 при контролите), които отразяват отклонението от типичните термограми за здрави индивиди, силно се различават от тези за контролите в началото на периода на мониториране (t_0) (Таблица 3).

Таблица 3. Концентрация на М протеина (г/л) в кръвния серум, калориметрични (отношение на специфичните топлинни капацитети на албумин и имуноглобулини, c_p^{HSA}/c_p^{Igs} , среден център на тежестта на термограмата, T_{FM}) и статистически (коефициент на корелация, r , метрично разстояние, P и метрично сходство, ρ) параметри, определени за изучаваните случаи на ММ и WM в началото на периода на мониториране (t_0) и за здрави индивиди ($n=21$, средни стойности $\pm SE$). н.о.- неопределени поради липса на ясен преход при 61 – 63 °С.

Случай	М протеин (г/л)	c_p^{HSA}/c_p^{Igs}	T_{FM} (°С)	r	P	ρ
контроли	-	2.56 ± 0.72	64.0 ± 1.1	0.97	0.76	0.85
$^L IgG_{p1}$	38.4	0.27	65.6	0.63	0.54	0.56
$^L IgG_{p2}$	49.4	0.41	70.1	0.47	0.53	0.51
$^L IgG_{p3}$	10.0	2.75	64.6	0.98	0.74	0.79
$^L IgM_{p1}$	54.8	н.о.	70.4	0.41	0.61	0.55
$^L IgM_{p2}$	41.7	0.26	71.7	0.33	0.51	0.46
$^L IgM_{p3}$	49.7	н.о.	69.3	0.54	0.56	0.55
$^L IgM_{p4}$	7.7	1.13	67.9	0.86	0.68	0.72
$^L IgM_{p5}$	43.6	0.30	70.9	0.36	0.53	0.48
$^L IgM_{p6}$	72.8	н.о.	65.8	0.66	0.54	0.57
$^L IgA_{p1}$	3.7	0.83	68.7	0.73	0.61	0.64

За всички проследени случаи (различни изотипове ММ и WM), прогресията на заболяването се свързва с промяна във формата на термограмата и енталпията ΔH на термограмите през периода на мониториране (примери са показани на Фиг. 8), въпреки че не се установява обща тенденция и изменението на тези параметри е строго индивидуално.

При някои точки на мониториране ДСК профилите се доближават в известна степен до термограмите, получени за здрави индивиди/контроли, докато при други точки термограмите се различават чувствително от контролния термодинамичен профил. За някои от случаите термограмите, регистрирани в отделните точки на мониториране попадат в различни калориметрични групи, дефинирани по-рано от Todinova et al., 2011 и Krutova et al., 2015, докато за други пациенти те попадат в една калориметрична група през целия период на мониториране. Не настъпва пълна ремисия по време на мониторирането на пациенти с ММ със секречия на IgG и IgM – нивата на М протеина спадат до 5 – 6 % от тоталното съдържание на протеини в серума, докато за $^L IgA_{p1}$ първоначално се регистрира М протеин с концентрация 5 %, и два месеца след започване на лечението М протеин не се детектира.



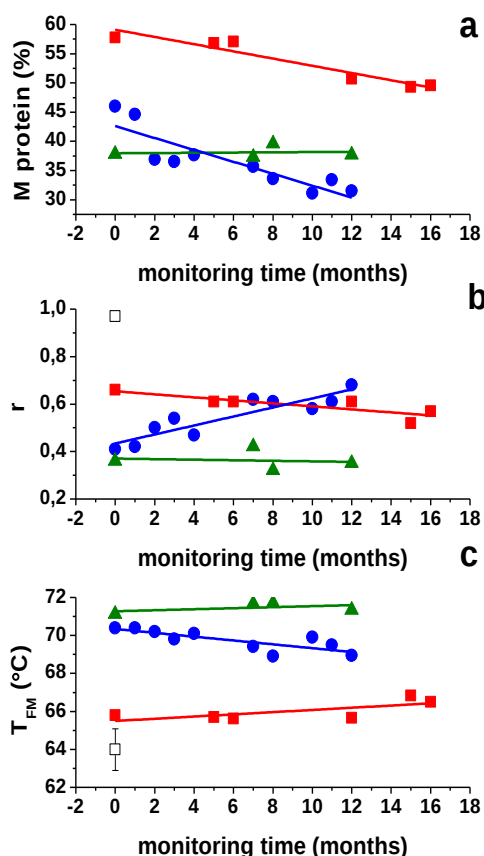
Фиг. 8. Серии от ДСК профили, получени при мониторирането на $^L IgM_{p1}$ (a), $^L IgM_{p6}$ (b), $^L IgM_{p5}$ (c) и $^L IgA_{p1}$ (d). t_n – последователни точки на мониториране, t_0 – начало на периода на мониториране, n – номер на месеца след t_0 . За яснота е представен контролният термодинамичен профил и стандартното отклонение (плътна линия и сива сянка).

При анализирането на връзката между нивото на М протеин в кръвния серум и калориметричните характеристики на пациентите с IgG MM, IgM MM и WM бяха наблюдавани три тенденции:

1. Обратна корелация между нивата на М протеина в серума и сходството във формата на термограмите, r , т.е. редуцирането на нивата на М протеина съответства на повишаване на стойността на r и обратно (${}^L\text{IgM}_{p1}$, Фиг. 9). Тази тенденция се установява IgG MM случая (${}^L\text{IgG}_{p1}$ и ${}^L\text{IgG}_{p2}$),

1 случай на IgM MM (${}^L\text{IgM}_{p1}$) и два случая на WM (${}^L\text{IgM}_{p1}$, ${}^L\text{IgM}_{p4}$). Това показва, че намаляването на нивата на М протеина в серума е свързано с изменение на термограмите по време на мониторирането, което ги приближава до калориметричния профил характерен за контролите, докато повишаването на съдържанието на М протеина води до допълнително отклонение от контролния калориметричен профил.

За три от изследваните случаи (${}^L\text{IgM}_{p1}$, ${}^L\text{IgM}_{p2}$, ${}^L\text{IgG}_{p2}$) намаляването на нивата на М протеина по време на мониторирането е свързано с отместване на T_{FM} към по-ниски температури (като по този начин се доближават до контролните стойности). Колкото по-изразено е намаляването на М протеина, толкова по-голяма е промяната в T_{FM} .



Фиг. 9. Мониториране на случаи на WM и секреторен MM. Промени в концентрацията на М протеина в кръвния серум (като процент от totalното количество протеини) (a), статистически параметър r (b) и средния център на тежестта на термограмата T_{FM} (c), за ${}^L\text{IgM}_{p6}$ (■), ${}^L\text{IgM}_{p5}$ (▲) и ${}^L\text{IgM}_{p1}$ (●). За сравнение, стойностите (и стандартното отклонение), определени за контролната група, също са представени в панелите b (○) и c (□).

За един случай ($^L IgM_{p4}$) увеличаването на нивата на М протеина корелира с повишаване на T_{FM} и допълнително отклонение на термограмата от типичния контролен калориметричен профил. За един случай ($^L IgG_{p1}$) редуцирането на концентрацията на М протеина е съпроводено от слабо повишаване на T_{FM} . В този случай, въпреки установената тенденция към повишаване на c_p^{HSA} през периода на мониториране, отразено от по-високи стойности на r , се наблюдава и разширяване на основния преход при около 67 °C и рамото при 75 °C, което води до по-високи стойности на T_{FM} .

Важно е да се отбележи, че пациентите в тази група имат различни съпътстващи заболявания (Таблица 2) и не се изключва възможността за повлияване на термодинамичните профили от тези заболявания. Редица проучвания целят установяването на специфични калориметрични характеристики на различни заболявания, но досега не е изследван кумулативния ефект на комбинацията от заболявания върху термограмите. Тъй като данните ни показват ясна връзка между промените във формата на термограмите и нивата на М протеина за повечето от изучаваните пациенти, изглежда, че конкретните съпътстващи заболявания (хипертензия, хиперплазия на простатата, тромбофлебит, камъни в бъбреците, ревматизъм и стоматид) оказват по-малко значим ефект върху термограмите от нивото на М протеини.

2. Постоянните нива на М протеина са съпътствани от константни стойности на калориметричните параметри T_{FM} и статистическите параметри r , P и ρ ($^L IgM_{p5}$, Фиг. 9), отново демонстрирайки корелация между имунологичните и калориметричните маркери.

3. Липса на корелация между съдържанието на М протеин и параметрите T_{FM} , r , P и ρ – редуцирането на М протеина е свързано със слабо изменение на коефициента r и T_{FM} , установено за $^L IgM_{p6}$ (Фиг. 9), $^L IgM_{p3}$ и $^L IgG_{p3}$. Трябва да се отбележи обаче, че за $^L IgM_{p6}$ концентрацията на М протеина остава много висока и спада незначително от 58 на 49 % по време на мониторирането, следователно не може да се очаква драстична промяна в r и T_{FM} . Този случай се характеризира със специфичен тип термограма, какъвто не е регистриран в досега изследваната кохорта от 39 IgM MM и 68 WM случаи, за които концентрацията на М протеина е най-много 43 % от тоталното съдържание на протеини.

По-голямо редуциране на нивото на М протеина (от 44 до 27 %) беше наблюдавано при мониторирането на $^L IgM_{p3}$, но въпреки това то остава много високо (27 % от тоталното съдържание на протеини в серума) при t_{12} и следователно не може да се очаква, че този спад в съдържанието на М протеина ще доближи формата на термограмата до тази, характерна за контролите. Изглежда, че термограмите от кръвен серум на този пациент са засегнати не само от WM, но и от наличието на хронична обструктивна белодробна болест, тъй като подобни типове ДСК профили са регистрирани за пациенти с това заболяване (Michnik et al., 2010). Това може да е причината за липсата на ясна връзка между нивата на М протеина и γ .

Подобно на динамиката във варирането на γ в хода на мониторирането, T_{FM} за $^L IgM_{p6}$ и $^L IgM_{p3}$ не се променя.

За $^L IgG_{p3}$ беше установено двукратно спадане на съдържанието на М протеина в серума, но γ не се променя значително и има стойности в интервала 0.91 – 0.98. T_{FM} варира в тесния диапазон от 63 до 66 °C, така тези два калориметрични параметъра остават близки до съответстващите им контролни стойности.

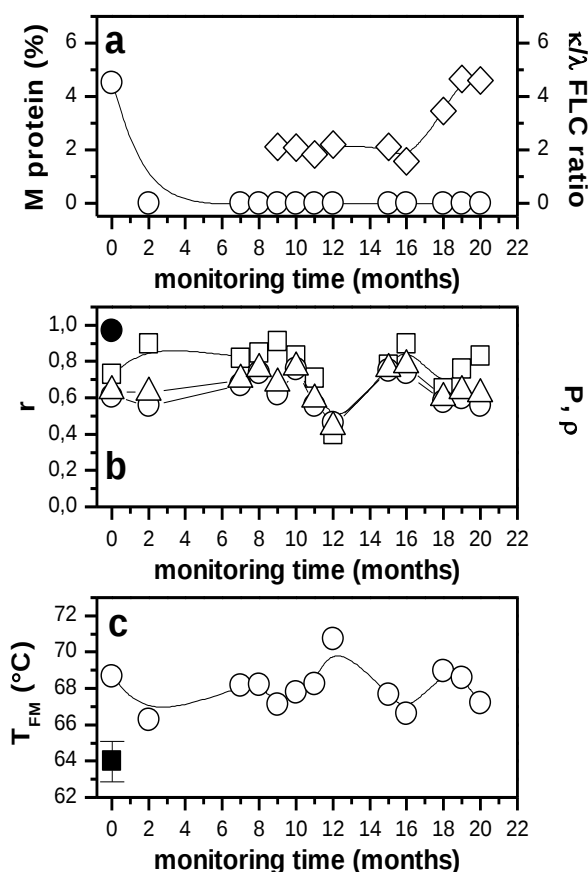
Тези резултати показват, че за повечето от проучените IgG MM, IgM MM и WM случаи (с изключение на $^L IgG_{p1}$ и $^L IgG_{p3}$) има строга корелация между варирането на нивата на М протеина и промените на калориметричните параметри γ и T_{FM} , следователно между имунологичните и калориметричните маркери.

Характеристиките на термограмите на случаите на WM и секреторен MM не зависят от rFLC и често много ниските стойности на γ са асоциирани със стойности на rFLC близки до референтните.

$^L IgA_{p1}$ случаят предизвиква интерес поради факта, че по време на мониторирането (при точка на мониториране t_2) преминава в FLC MM и след първата точка на мониториране М протеин не се детектира, но калориметричните параметри осцилират приближавайки или отклонявайки се от референтните стойности (Фиг. 10). Важно е да се отбележи, че термограмите, регистрирани при проследяването на този пациент наподобяват характерните за NS MM и FLC случаите, за които по-рано беше установено, че фактори различни от М протеина засягат температурните преходи (Todinova et al., 2014). Пациентът реагира добре на

химиотерапията и по време на мониторирането моноклоналният IgA се редуцира напълно. До t_{16} отношението rFLC остава близко до горната референтна граница, но след тази точка постепенно се повишава. Нивата на $\beta_2\text{м}$ са в диапазона от 1.8 до 3.8 мг/л, т.е. в рамките на или близки до референтните стойности (1 – 2,4 мг/л) (Фиг. 10). Когато няма секреция на М протеин, rFLC е обективен маркер за прогресията на заболяването. За разглеждания $^L\text{IgA}_{p1}$ обаче този параметър не показва добра корелация с r (Фиг. 10). Между 9-ти и 16-ти месец, когато rFLC остава непроменено, се наблюдава намаляване на r от 0.9 до 0.4, последвано от възстановяване на стойностите и достигане на такива близки до контролните. След 16-тия месец rFLC нараства значително и стойностите му са над горната референтна граница, а първоначалното спадане на r до 0.65 е последвано от повишаване до 0.83 (Фиг. 10).

Както се вижда от Фиг. 34 стойностите за T_{FM} , r , P и ρ осцилират по време на мониторирането. Максимумът на T_{FM} съответства на минимума на r , P и ρ , и обратното.



Фиг. 10. Мониториране на $^L\text{IgA}_{p1}$ с преминаване към FLC MM. Вариране на концентрацията на М протеина (като % от общото съдържание на протеини в серума) (а), (○) и отношението κ/λ FLC, (а), (◇, данни получени за 9 – 20 месеца), статистическите параметри r (□), P (○), ρ (Δ) (b) и средния център на тежестта на термограмата T_{FM} (c) (○), определени за всички точки от периода на мониторирането. За сравнение са представени стойностите на T_{FM} (и стандартното отклонение) и коефициента r , определени за контролната група в панели b (●) и c (■).

Нашите ДСК изследвания разкриват, че MM и WM показват хетерогенни калориметрични характеристики, които могат да бъдат категоризирани въз основа на броя и позицията на последователните температурни преходи, C_p^{HSA}/C_p^{Igs} и сходството във формата на термограмите (отразено в коефициента r). Тъй като формата на термограмите (коефициента на корелация, r) и T_{FM} са силно зависими от броя на преходите и отношението на специфичните им топлинни капацитети, може да се предполага, че тяхната промяна е представителна за степента на отклонение на термограмите на пациентите от типичните профили на здравите индивиди, както беше показано в глава 2 в дисертацията. Метричното сходство ρ и средния център на тежестта на термограмата T_{FM} корелират с концентрацията на моноклоналните IgM протеини (Фиг. 5 b и c, Krumova et al., 2015), също и с dHLC и следователно отразяват клиничния статус на пациентите (Фиг. 6 c, Krumova et al., 2015). Допълнително беше проведено проучване за по-нататъшно оценяване на IgG MM, IgM MM и WM случаи (7 от 10 пациента), при които се установи съответствие между нивата на М протеина и калориметричните и статистическите параметри, по-специално коефициента на корелация, r . Това предполага, че статистическият параметър r може да се използва като комплементарен параметър за оценка на обективния статус на пациентите със секреторен MM.

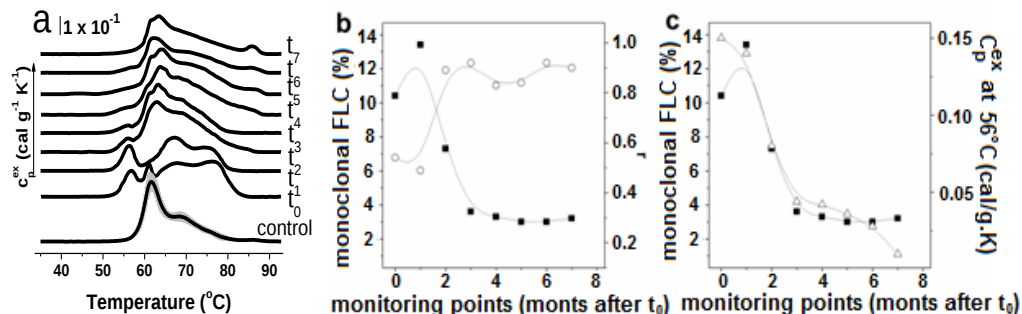
Резултатите от провеждането на статистика по Wilcoxon показва 67 % възстановяване на региона на албумина в термограмите, регистрирани за случаите на IgG MM към този на контролите и едва 17 % възстановяване на региона на имуноглобулините. Регионът в който денатурира албумина демонстрира 20% възстановяване, а регионът на имуноглобулините – едва 2,86 % за IgM MM пациентите. За $^L IgA_{p1}$, статистиката на Wilcoxon определя 38,5 % възстановяване на региона на албумина и 7,7 % за региона, в който денатурират имуноглобулините. Сравняването на данните, получени от проведения непараметричен статистически анализ и нивата на М протеина в кръвния серум показва, че редуцирането на моноклоналния протеин води до приближаване на калориметричните профили, регистрирани за

пациентите към характерните за контролите, в съответните температурни области.

3.2. Мониторирание на пациенти с мултиплен миелом със секречия на моноклонални свободни леки вериги и несекреторен мултиплен миелом по време на лечението им

С цел да се проследят динамиката на изменение на калориметричните параметри при проследяване на FLC и NS MM пациенти, проследихме 1 пациент с FLC MM и 10 пациента с NS MM по време на лечението им. Стойностите на имунологичния параметър rFLC и коефициента на корелация r , определени за тези пациенти са показани на Таблица 4.

Серията термограми, регистрирани за ${}^L\text{FLC}_{p1}$ са представени на Фиг. 11 а. За ${}^L\text{FLC}_{p1}$ стойностите на r в хода на лечението варират в интервала от 0.42 до 0.92, като най-отдалечени от контролните стойности са тези в



Фиг. 11. (а) Серию от калориметрични профили регистрирани при мониторирането на ${}^L\text{FLC}_{p1}$. ДСК термограмите са регистрирани в началото (t_0) и в определени точки по време на мониторирането (t_n) в хода на приложеното лечение. За сравнение е представен и усреднен калориметричен профил (черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка) за здрави индивиди. (б) Корелация между нивата на моноклоналните свободни леки вериги и коефициента на корелация, r . (в) Корелация между нивата на моноклоналните леки вериги и специфичния топлинен капацитет на прехода при 56 °C.

първите две точки на мониториране (Фиг. 11 б). Определените стойности за r след третата точка на мониториране са близки до типичните за

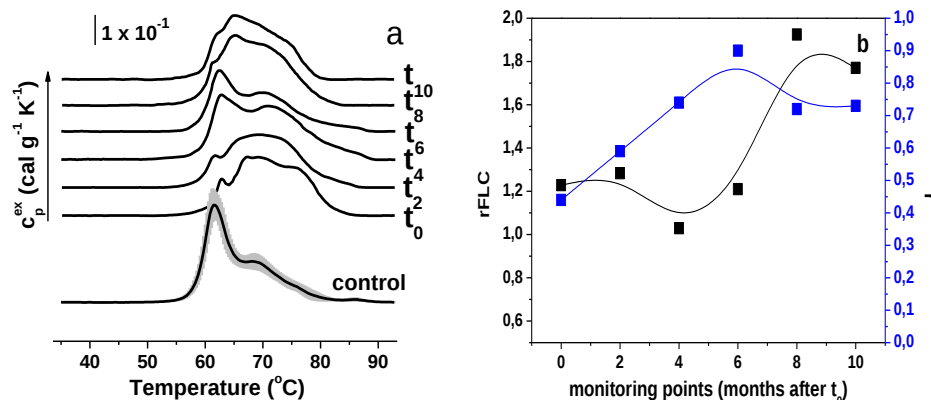
контролите. Преходът при 56 °C, който е ясно изразен за първата точка от периода на мониториране с времето изчезва (Фиг. 11 а). Амплитудата му корелира с количеството моноклонални FLC, съответно може да се приеме, че този преход се дължи на денатурацията на свободни леки вериги (Фиг. 11 с), в потвърждение на наблюдения на Todinova et al. (2014). Температурата на основния преход варира в температурния интервал от 61 до 65 °C до края на мониторирането.

За случаите на NS MM наблюдавахме, че при 9 от тях имунологичният параметър rFLC е в рамките на нормата (Таблица 4), което е силен индикатор за ремисия на заболяването. При един случай в определени точки от мониторирането той е над нормата (Таблица 4), което говори, че подобрението на състоянието на пациентите не е стабилно. При нито един

Таблица 4. Стойности на отношението на κ и λ свободни леки вериги (rFLC) и на коефициента на корелация r (интервали на вариация) за случаите на несекреторен миелом (NS MM). н.и. – не е изчислено за концентрации на κ и λ леките вериги над допустимите изчислителни възможности на апарата.

Проба	rFLC	r
${}^LNS_{p1}$	0.6 – 1.5	0.81– 0.98
${}^LNS_{p2}$	0.001 – н.и.	0.62 – 0.96
${}^LNS_{p3}$	1.2 – 12.8	0.82 – 0.91
${}^LNS_{p4}$	1.5 – н.и.	0.55 – 0.96
${}^LNS_{p5}$	0.7 – 1.2	0.75 – 0.92
${}^LNS_{p6}$	0.8 – 1.8	0.77 – 0.89
${}^LNS_{p7}$	0.9 – 1.9	0.56 – 0.97
${}^LNS_{p8}$	1.9 – 4.6	0.68 – 0.98
${}^LNS_{p9}$	1.4 – 2.1	0.20– 0.97
${}^LNS_{p10}$	1.0 – 1.9	0.44 – 0.90

от проследените случаи на несекреторен миелом не беше установена корелация между промяната на отношението rFLC и тази на статистическия параметър r . Характерен пример е показан на Фиг. 12, от която става ясно, че дори в случаите когато rFLC е в рамките на интервала на референтните стойности при всички точки на мониториране, в някои от тях стойностите на r могат да бъдат много под тези характерни за контролите.



Фиг. 12. (a) Серии от калориметрични профили регистрирани при мониторирането на $^LNS_{p10}$. ДСК термограмите са регистрирани в началото (t_0) и в определени точки по време на мониторирането (t_n) в хода на приложеното лечение. За сравнение е представен и усреднен калориметричен профил (черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка) за здрави индивиди (b). Вариации на имунологичния параметър $rFLC$ и корелационния коефициент r в хода на мониторирането.

Статистиката на Wilcoxon демонстрира добро възстановяване на региона на албумина в калориметричните профили на пациентите, при които не се установява М протеин в кръвния серум, което потвърждава твърдението, че намаляването на нивата на М протеина в серума води до приближаване на термограмите към типичните за контролите. Незначителното възстановяване на региона на имуноглобулините демонстрира ясна връзка между присъствието на фактори/лиганди с неизвестна природа (различни от М протеина) в кръвния серум и отклоненията на термодинамичните профили на пациентите от профилите на здравите индивиди.

4. Мониториране на пациенти с мултиплен миелом подложени на автоложна трансплантация на стволови клетки

4.1. Характеристика на пациентите преди автоложна трансплантация на стволови клетки

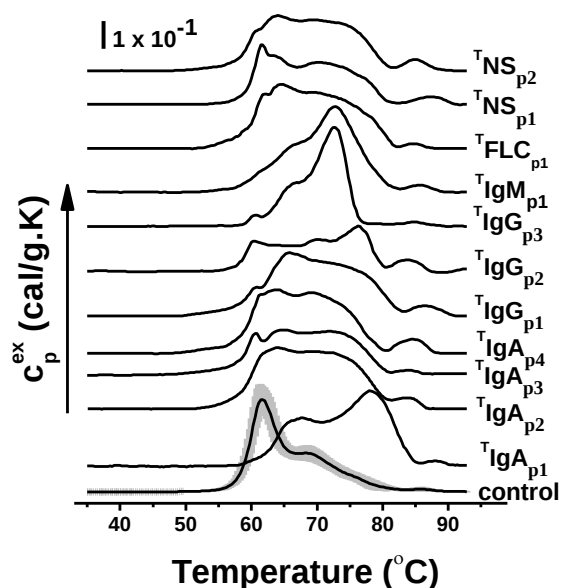
Беше проследено състоянието на 8 пациента със секреторен MM (IgG, IgM, IgA MM), 2 пациенти с NS MM и един случай на FLC MM. Клиничните характеристики на пациентите преди и след АТСК са представени в Таблица 5. Концентрациите на албумин и β_2 м в кръвния серум са в рамките на референтния интервал или близки до него както преди, така и след АТСК. Имунологичните маркери М протеин, отношението rFLC и dHLC параметъра варират в много широк интервал при различните пациенти (Таблица 5).

Таблица 5. Клинични характеристики на MM пациенти, изследвани преди и след АТСК. Представени са средни стойности и стандартно отклонение.

Параметър	Контроли	MM пациенти	
Брой индивиди	21	11	
Възраст	47 $\pm$ 11	54.7 $\pm$ 7	
		Преди АТСК	След АТСК
Албумин (г/л)	40.2 – 47.6	44.4 $\pm$ 2.0	45.4 $\pm$ 3.0
β_2 – микро глобулин (мг/л)	1 – 2.4	2.9 $\pm$ 1.0	2.7 $\pm$ 1.0
М протеин (%) [*]	–	1.6 – 48.8	0 – 21.0
rFLC	0.26 – 1.65	0.007 – 27.4	0 – 10.5
dHLC	0.07 – 0.62	0.31 – 37.7	0.05 – 16.4

^{*}Параметри, определени за случаите със секрция на М протеин след АТСК

Калориметричните профили на всички изследвани случаи непосредствено преди АТСК (Фиг. 13) и термодинамичните параметри, получени от термограмите (Таблица 6) се отклоняват съществено от типичните термограми за здрави индивиди.



Фиг. 13. Термограми на пациенти, диагностицирани с различни форми и изотип ММ, регистрирани преди провеждането на АТСК.

Статистическият тест на Wilcoxon разкри, че всички термограми, регистрирани преди АТСК се различават значително от контролните калориметрични профили в температурния регион, в който денатурират глобулините (65 – 80 °C), а при два случая от всички изследвани пациенти ($^{T}IgA_{p4}$ и $^{T}FLC_{p1}$ FLC ММ) за региона на албумина (55 – 65 °C) тестът на Wilcoxon показва статистическо сходство с контролните термограми.

Обща характеристика е силно редуцираният, макар и в различна степен за отделните разглеждани случаи, c_p^{HSA} при около 61 – 63 °C в сравнение с контролите (Таблица 6). Причината за това не се дължи на промяната на концентрацията на албумина, а на температурната стабилизация на голяма фракция от молекули албумин, последвана от отместване на температурния преход и припокриването му с прехода на глобулините, центриран при около 70 °C.

Отместването на прехода на денатурация на албумина е по-голямо в случаите с високо съдържание на М протеин преди АТСК ($^{T}IgA_{p1}$, $^{T}IgG_{p2}$, $^{T}IgG_{p3}$ и $^{T}IgM_{p1}$ с концентрация на М протеина в кръвния серум повече от 20 % от тоталното протеиново съдържание), където c_p^{HSA} е по-нисък от контролните стойности или дори не се наблюдава във всички случаи (Фиг. 13, Таблица 6). Освен това c_p на прехода при и над 70 °C има чувствително по-голяма амплитуда при ММ пациентите в сравнение с контролите. Като следствие от тези събития, основният преход е отместен от 61.9 °C при контролите до 72.6 – 76.3 °C при пациентите и T_{FM} е повишен от 64 до 68 – 74.5 °C за всички пациенти преди АТСК (Таблица 6). Тези промени в

специфичните топлинни капацитети и температурите на денатурация на отделните преходи водят до значително намаляване на стойностите на коефициента на корелация r (под 0.6) в сравнение с типичната стойност, определена за контролите (0.97). В допълнение, причината за по-ниските стойности на енталпията остават неизяснени. Серумните термограми на пациентите могат да бъдат засегнати от заболяването и следователно може да се допусне, че именно то допринася за промяната в цялостната форма на термограмата и по този начин повлиява стойностите на коефициента r , получени при статистическия анализ.

Таблица 6. Концентрация на М протеина (% от тоталния протеин) и калориметрични параметри, получени от термограмите на изучаваните пациенти с ММ преди подлагането им на АТСК: специфичен топлинен капацитет на температурния преход на албумина (c_p^{HSA}), температура на денатурация на основния преход (T_m^{mp}), среден център на тежестта на термограмата (T_{FM}), коефициент на корелация (r), отразяващ сходството във формата на тест- и референтната термограма, н.о. – неопределени, поради липсата на ясен преход на албумина при 61 – 63 °C.

Случай	М протеин	c_p^{HSA} (cal/g.K)	T_m^{mp} (°C)	T_{FM} (°C)	r
контроли	-	0.35	61.9	64.0	0.97
$^T IgA_{p1}$	22.2	н.о.	78.3	74.5	0.09
$^T IgA_{p2}$	0	0.22	64.0	68.8	0.77
$^T IgA_{p3}$	1.6	0.17	64.8	68.0	0.64
$^T IgA_{p4}$	0	0.24	63.7	68.0	0.82
$^T IgG_{p1}$	0.7	0.23	65.7	69.9	0.57
$^T IgG_{p2}$	19.8	0.12	76.4	71.1	0.58
$^T IgG_{p3}$	48.8	0.04	72.7	71.0	0.32
$^T IgM_{p1}$	26.0	н.о.	72.8	71.4	0.46
$^T FLC_{p1}$	2.3	0.21	64.5	68.4	0.74
$^T NS_{p1}$	0	0.23	61.6	68.5	0.90
$^T NS_{p2}$	0	0.21	63.8	68.6	0.75

В случаите $^T IgA_{p2}$, $^T IgA_{p3}$, $^T IgA_{p4}$ и $^T IgG_{p1}$, диагностицирани първоначално (при t_0) като секреторни, непосредствено преди АТСК или не се регистрират М протеини или те са в много ниски концентрации (0 до 0.7 % от тоталното количество протеини в серума). В периода на нашето изследване заболяването преминават от секреторен към NS ММ и калориметричните характеристики демонстрират висока степен на сходство

с тези типични за NS MM (Todanova et al., 2014). Преди АТСК стойностите на c_p^{HSA} са 1.5 – 2.0 пъти по-ниски от тези на контролите (Таблица 6). Увеличаването на c_p на прехода при 70 °C за тези 4 случая в сравнение с контролите е много по-слабо изразено от това за случаите на секреторен MM, а температурата на основния преход е максимум 66 °C. Стойностите на r за тези случаи варират между 0.57 и 0.82 (Таблица 6).

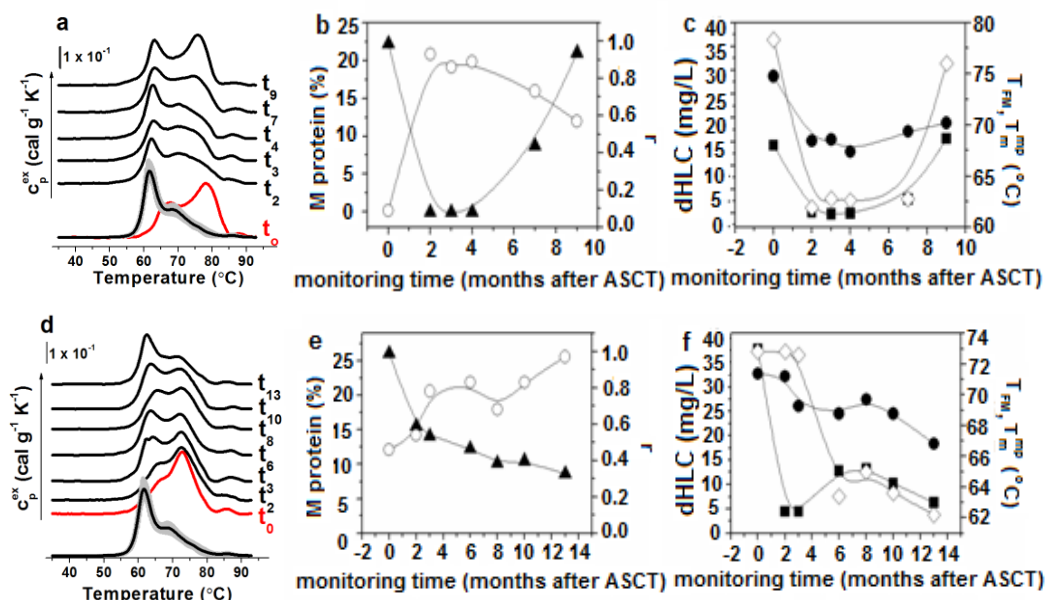
За случаите на NS MM и FLC MM преди АТСК са установени 1.5 – 2.3 пъти по-ниски по-ниски стойности на c_p^{HSA} от типичните за контролите, стойности за r в интервала 0.74 – 0.9 и T_m от 62 до 64 °C. Характерна особеност на тези случаи е разцепването на прехода на албумина на два отделни прехода локализирани при 61 и 64 °C. Интересно е, че тази характеристика се открива и при случаите с малко количество М протеини в серума преди АТСК ($^{T}IgA_{p2}$, $^{T}IgA_{p3}$, $^{T}IgA_{p4}$ и $^{T}IgG_{p1}$, Фиг. 13).

4.2. Ефект на автоложната трансплантация на хемопоетични стволови клетки върху пациенти със секреторен мултиплен миелом

За четири от случаите на секреторен MM ($^{T}IgA_{p1}$, $^{T}IgG_{p2}$, $^{T}IgG_{p3}$, и $^{T}IgM_{p1}$) се наблюдава различен ход на промяната на: (1) М протеинът е детектиран преди и след АТСК. В два от тези случаи ($^{T}IgM_{p1}$, (Фиг. 14 d – f) и $^{T}IgG_{p2}$) М протеинът постепенно намалява след АТСК през целия период на мониториране от 13 – 16 месеца; (2) за другите два случая намаляването на нивата на М протеина в серума, наблюдавано до t_{12} при $^{T}IgG_{p3}$ и до t_4 при $^{T}IgA_{p1}$ е последвано от увеличаване, най-силно изразено при $^{T}IgA_{p1}$ (Фиг. 14). Въпреки това след трансплантацията се наблюдава тенденция към силно редуциране на процентното съдържание на М протеина за всички случаи със секреторен MM, показателно за позитивния ефект от АТСК (Фиг. 14).

Статистическият анализ на Wilcoxon разкри, че $^{T}IgG_{p3}$, е единственият мониториран пациент, за който не се наблюдава никакво възстановяване на термограмите в региона на албумина по време на целия период на мониториране, докато за $^{T}IgA_{p1}$ се наблюдава възстановяване в региона на

албумина още за първата точка на мониториране след провеждането на АТСК и се запазва през цялата серия на проследяване. За половината от точките на мониториране, регистрирани за $^T IgM_{p1}$ и $^T IgG_{p2}$, регионът на албумина показва сходство с този в контролните термограми.



Фиг. 14. Мониториране на $^T IgA_{p1}$ (a-c) и $^T IgM_{p1}$ (d-f). Калориметричните профили са получени преди (t_0) и след (t_n) АТСК за $^T IgA_{p1}$ (a) и $^T IgM_{p1}$ (d). За сравнение е представена усреднената термограма на здравите индивиди (плътна черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка). Стойностите на М протеина (b, e, ▲), dHLC (c, f, ■), коефициента на корелация r (b, e, ○) и термодинамичните параметри T_m (c, f, ◇) и T_{FM} (c, f, ●) са представени за всяка точка на мониториране.

Бяха мониториран промените в dHLC и беше установено, че при четири от случаите на секреторен ММ този параметър силно намалява след провеждането на трансплантацията и достига референтни стойности с динамика подобна на изменението на нивата на М протеина, но за три от случаите след 7 – 16 месеца dHLC се повишава, показателно за появата на моноклонални протеини в серума.

Освен това беше установена обратна корелация между промените в нивата на М протеина в кръвния серум и коефициента на корелация r , който само в някои точки на мониториране се повишава и се доближава до 1 ($^T IgM_{p1}$, t_{14} , Фиг. 14 e) и когато не се детектира М протеин r има стойност близка до референтната (0,94) ($^T IgG_{p3}$, t_{12}). Намаляването на процентната концентрация на М протеина в кръвния серум (Фиг. 14 b) се свързва със

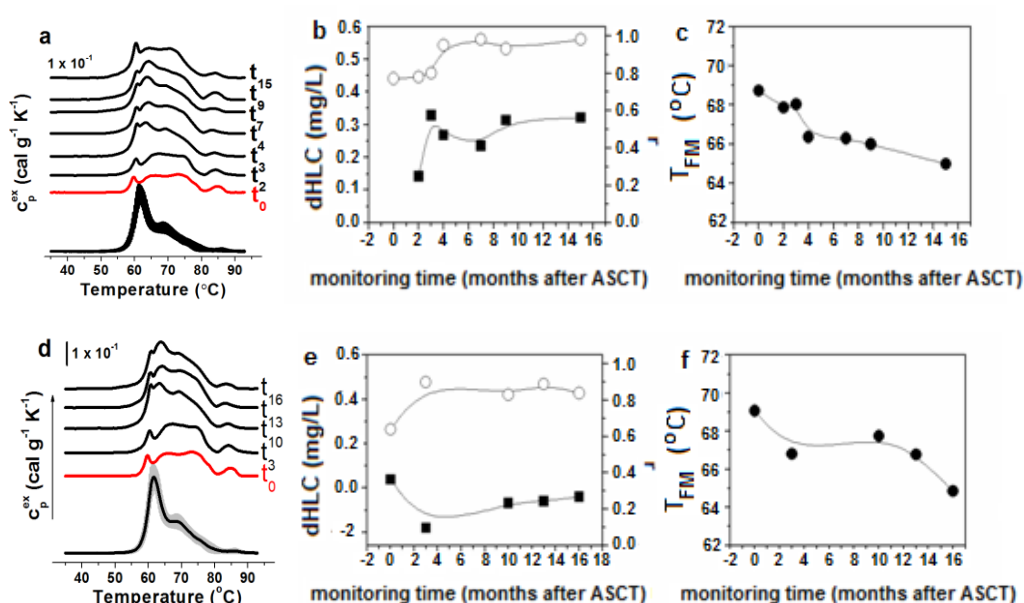
значително отместване на основния преход от 78 до 62 °C, също както и в T_{FM} , но по-слабо изразено – от 76 до 68 °C (Фиг. 14 с, f). Най-силна е корелацията между промените в нивата на М протеина и коефициента на корелация r .

За случаите на секреторен ММ ($^T IgA_{p2}$, $^T IgA_{p3}$, $^T IgA_{p4}$, $^T IgG_{p1}$), които преминават в несекреторен присъствието на малки количества М протеин се определя с помощта на “Heavylyte” тест. Само за $^T IgG_{p1}$ в някои точки на мониториране стойността на dHLC параметъра е по-висока от референтните стойности (горната референтна стойност 0.62). За останалите случаи dHLC е в норма.

Обща характеристика на тези случаи е наличието на преход при 65 °C в началото на периода на мониториране (преди АТСК, t_0), който вероятно се дължи на фракция стабилизирал албумин, докато след трансплантацията в хода на мониторирането този преход се връща към 63 °C ($^T IgA_{p2}$, Фиг. 15 а) или запазва постоянна своята позиция ($^T IgA_{p3}$, Фиг. 15 d). Статистиката на Wilcoxon обаче показва, че регионът на албумина в регистрираните серии от калориметрични профили за $^T IgA_{p2}$ и $^T IgA_{p4}$ е сходен с този в термограмите на контролите, докато при всички точки на мониториране на $^T IgG_{p1}$ се различава от профилите на контролите и от първите две точки на мониториране на $^T IgA_{p3}$ след провеждането на трансплантацията. Става ясно, че тестът на Wilcoxon не обяснява разцепването на прехода на денатурация на албумина, който се наблюдава в тесен температурен интервал (< 2 °C).

Значително се различават калориметричните профили на пациентите от тези на контролната група дори в случаите, когато c_p в региона на албумина е близък по стойност до типичната за контролите. Съответно за тези случаи T_m варира в тесен интервал – от 61 до 65 °C преди и след трансплантацията, обратно на случаите на ММ с изявена секреция на М протеин (78 – 62 °C). T_{FM} постепенно намалява и достига стойности близки до контролните при последната точка на мониториране за $^T IgA_{p2}$ и $^T IgA_{p3}$ (Фиг. 15 с, f) докато намаляването му е значително и достига 67 – 68 °C за $^T IgA_{p4}$ и $^T IgG_{p1}$. Варирането на коефициента r демонстрира различна динамика за отделните пациенти по време на мониторирането след АТСК, но за всички случаи се наблюдава постепенно повишаване на r и стойността

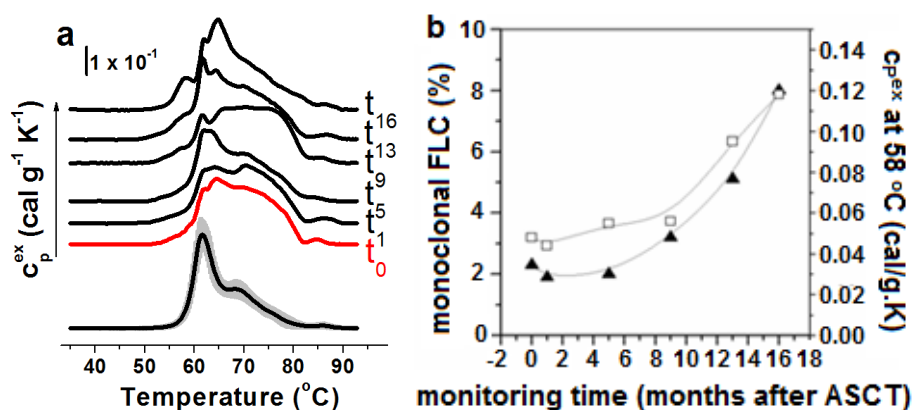
му е по-висока от определената преди трансплантацията. За $^{T}IgA_{p2}$ се наблюдава рязко повишаване на r между t_3 и t_4 и до t_{16} , стойностите на този параметър са близки до контролните (Фиг. 15 b). За $^{T}IgA_{p4}$ r се повишава рязко и при t_{12} достига стойности характерни за контролите. За $^{T}IgA_{p3}$ и $^{T}IgG_{p1}$ r се различава значително от контролите през целия период на мониториране. Трябва да се отбележи, че за тази група пациенти стойностите на dHLC параметъра в периода на проследяването са в границите на референтния интервал (с изключение на четири точки на мониториране на $^{T}IgG_{p1}$).



Фиг. 15. Мониториране на $^{T}IgA_{p2}$ (a-c) и $^{T}IgA_{p3}$ (d-f). Последователните калориметрични профили са регистрирани преди (t_0) и след АТСК (t_n) за $^{T}IgA_{p2}$ (a) и $^{T}IgA_{p3}$ (d). За сравнение е представена усреднената термограма за контроли (плътна черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка). Стойностите на dHLC (b, e, ■), r (b, e, ○) и T_{FM} (c, f, ●) са представени за всяка точка на мониториране.

Сериите от калориметрични профили за пациент с ММ със секрция на моноклонални FLC в кръвния серум са представени на Фиг. 16 а. При този пациент липсва положителен отговор към трансплантацията – след провеждането ѝ нивата на моноклоналните FLC се запазват. При t_5 дори започва постепенно нарастване на тяхното количество, в рязък контраст със случаите на секреторен ММ, при които както вече беше споменато, нивата на моноклоналните протеини намаляват в отговор на АТСК. Freelite тестът

показва много ниско отношение κ/λ , разкриващо присъствието на λ моноклонални свободни леки вериги. $\beta 2\text{м}$ е над горната граница на референтния интервал по време на целия период на мониториране и се увеличава драстично при t_{16} , което е индикатор за прогресия на заболяването. Коефициентът на корелация r не корелира с нивата на FLC в кръвния серум. Девет месеца след АТСК се наблюдава появата на температурен преход при 58°C – уникална характеристика, установена до момента за FLC MM (Todinova et al., 2014, 2016) и една подгрупа IgM MM. За тази точка на мониториране нивата на моноклоналните FLC в серума започват да се повишават и изменението на c_p^{ex} на прехода при 58°C корелира добре с концентрацията им, което потвърждава произхода на този преход, а именно, денатурацията на моноклоналните FLC.



Фиг. 16. Серия от термограми, регистрирани за пациент с ММ със секреция на моноклонални свободни леки вериги в кръвния серум (а). Последователните калориметрични профили са получени преди (t_0) и след (t_n) АТСК. За сравнение е представена усреднената термограма на здрави индивиди (плътна черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка). Стойностите на моноклоналните свободни леки вериги като % от тоталното съдържание на протеини в кръвния серум (b, $\blacktriangle$) и специфичния топлинен капацитет на прехода при 58°C (b, $\square$) са представени за всяка точка на мониториране.

Регионът, в който денатурира албумина в термограмите, регистрирани в t_1 и t_5 не се различават съществено от контролните калориметрични профили според теста на Wilcoxon поради тесния температурен диапазон, в който се появява разцепването на прехода на албумина. Интересно е, че регионът на албумина в калориметричния

профил, регистриран в t_{13} също не се различава съществено от този в термограмите на контролната група, въпреки че разцепването на прехода при 62 °C е добре изразено.

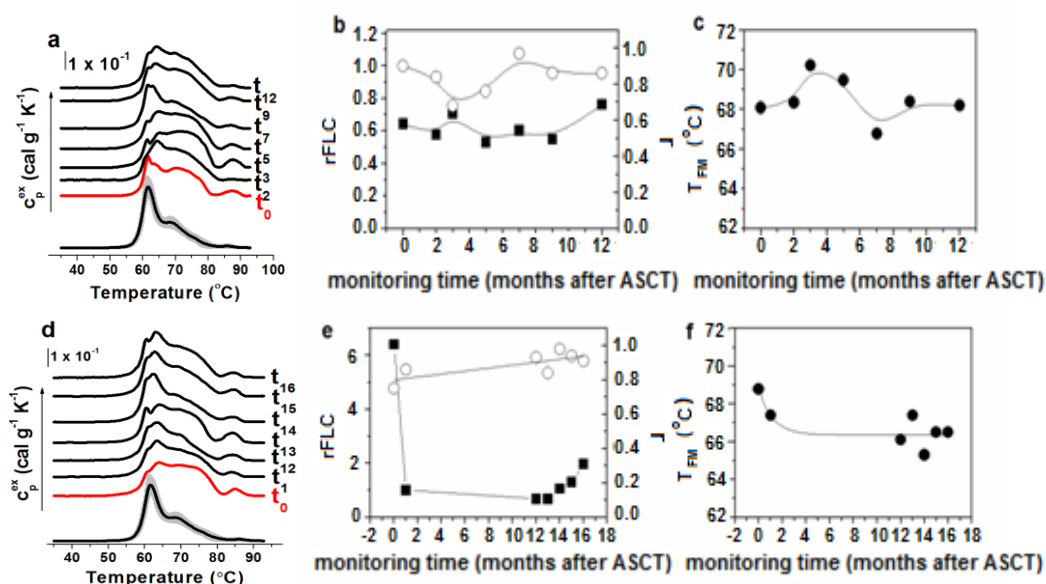
4.3. Ефект на автоложната трансплантация на хемопоеетични стволови клетки върху пациенти с несекреторен мултиплен миелом

Калориметричните профили, регистрирани за двама пациенти с NS MM преди и след подлагането им на трансплантация (Фиг. 17 а, d), демонстрират силно отклонение от типичните профили на здравите индивиди, въпреки че в серума на пациентите не се детектират М протеини. Обща характеристика за тези два случая е разцепването на прехода на албумина, което се запазва след АТСК – поведение, типично за 83 % от случаите на NS MM, установено при предишни проучвания на тази форма на заболяването (Todanova et al., 2014).

Имунологичните параметри rFLC, концентрация на албумин и β_2 м са в границите на референтния интервал и не се откриват плазмоцити по време на целия период на мониториране за $^TNS_{p1}$, което говори за ремисия на заболяването. Въпреки това стойностите на калориметричните параметри се отклоняват от определените за контролите – r осцилира и само при t_7 достига контролна стойност, T_m варира в интервала 62 - 65 °C, а стойностите на T_{FM} °C между 67 и 70 °C (Фиг. 17 c). Само за точката t_7 регионът на албумина се възстановява и се показва сходство с контролите ($W = 0.05$).

За $^TNS_{p2}$ преди АТСК са детектирани 0.2 % плазмоцити и rFLC е над нормата. След АТСК не се откриват плазмоцити и rFLC намалява драстично, попадайки в рамките на референтния интервал (Фиг. 17 e) – показатели, които сочат позитивния отговор на пациента към трансплантацията. Увеличаването на r и намаляването на T_{FM} води до приближаване на тези параметри към стойности, типични за контролите само в t_{14} (Фиг. 17 e, f). Регионът на албумина е близък до този на контролите само в t_{14} и t_{15} ($W = 0.05$). Тези данни потвърждават по-ранните

предположения за съществуването на фактори (специфични биомаркери), различни от моноклоналните свободни леки вериги, които модифицират калориметричния профил на NS MM пациентите (Todanova et al., 2014).



Фиг. 17. Мониториране на T_{NSp1} (a-c) и T_{NSp2} (d-f). Последователните калориметрични профили са получени преди (t_0) и след (t_n) АТСК за T_{NSp1} (a) и T_{NSp2} (d). За сравнение е представена усреднената термограма на здравите контроли (плътна черна линия) и стандартното отклонение (сива сянка). Стойностите за rFLC (b, e, ■), r (b, e, ○) и T_{FM} (c, f, ●) са представени за всяка точка на мониториране.

Важно е да се отбележи, че за случаите, които преминават от секреторен към несекреторен ММ (с изключение на T_{IgGp1}) имунологичният маркер dHLC е в рамките на референтните стойности след АТСК. Въпреки това калориметричните параметри, получени за повечето точки на мониториране се отклоняват от тези на контролите. Причината за това все още не е изяснена, но доказва наличието на заболяване на кръвта, свързано с аномални молекулни взаимодействия, които се детектират посредством ДСК, но не и със стандартните имунологични тестове за ММ.

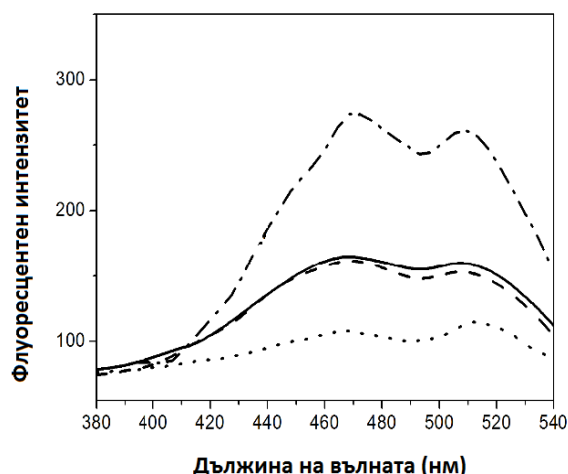
Освен това, прилагайки статистиката на Wilcoxon установихме, че за 50 % от термограмите, регистрирани за различните точки на мониториране след АТСК областта в термограмата приписвана на денатурирането на албумина е близка до тази на контролите, което предполага, че след трансплантацията албуминът се връща към неговата естествена за здрави

индивиди конформация. От друга страна преходът на глобулините не се възстановява в никоя от получените термограми след трансплантацията. Два фактора могат да допринасят за този ефект – присъствието на М протеин след трансплантацията, който денатурира в региона на глобулините и/или присъствието на лиганд-свързана фракция на албумина, чийто температурен преход се припокрива с този на имуноглобулините.

5. Сравнение на термодинамичния подход и метода за диагностика на малигнени състояния на базата на флуоресцентните характеристики на серумния NAD(P)H

Пациентите, диагностицирани с ММ, бяха изследвани и с друга неинвазивна биофизична техника, която се базира на флуоресценцията на серумния NAD(P)H като индикатор за метаболитна дисфункция и наличие на онкологично заболяване (Mikirova et al., 2003). NAD(P)H е основен флуорофор в кръвния серум и намаляването на неговата флуоресценция е показател за наличието на малигнено заболяване. За да бъде оценен потенциала на предложението от Wolfbeis & Leiner, 1985 метод за диагностика, на базата на флуоресцентните характеристики на NAD(P)H, при случаите на ММ, бяха изследвани 52 пациенти, диагностицирани с IgM-MM. С цел да се установи чувствителността на метода, резултатите от него бяха сравнени с данните от имунологичните и калориметрични тестове.

Флуоресцентните спектри на NAD(P)H на здрави контроли и пациенти с IgM-MM се характеризират с две големи емисионни ивици, локализирани при 470 нм (емисия на NAD(P)H) и при 510 нм (емисия на флавин мононуклеотид) (Wolfbeis & Leiner, 1985) (Фиг. 18). Докато интензитетът на емисионните спектри регистрирани за контролите варира в тесен интервал, при IgM-MM пациентите той варира в много широк интервал, като се установяват случаи с емисионни спектри припокриващи се с тези регистрирани за контролите, както и такива със значително по-висок или по-нисък интензитет (Фиг. 18).

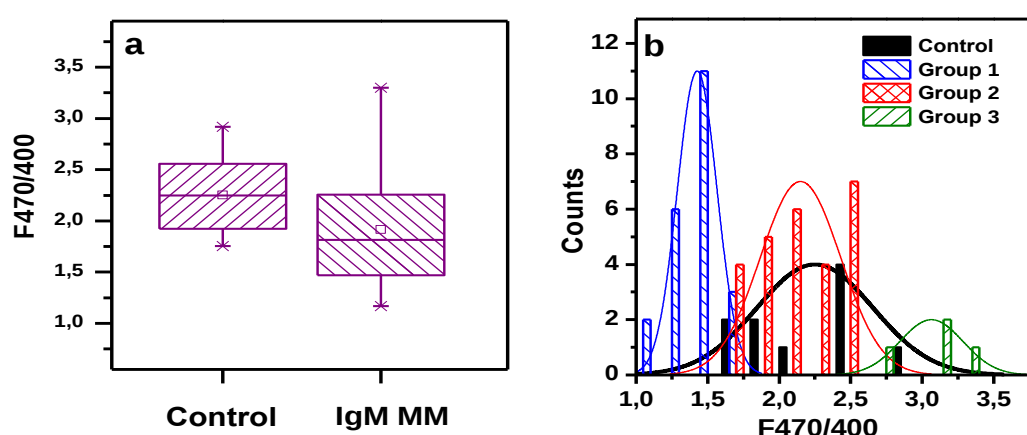


Фиг. 18. Типичен емисионен спектър на NAD(P)H на здрави индивиди (плътна черна линия) и пациенти с IgM-MM, за които отношението F470/400 е в рамките на референтния интервал (прекъсната линия), под долната граница на референтния интервал (пунктирна линия) и над горната граница на интервала на референтните стойности (линия от точки и тирета).

Установено е, че отношението между емисията при 470 nm и 400 nm ($F_{470/400}$) е маркер за малигнени заболявания, като неговата редукция се счита за показателна за наличието на различни типове онкологични заболявания (Mikirova et al., 2003). В нашите изследвания средната стойност на $F_{470/400}$ определена за изследваните пациенти е по-ниска от тази на контролите, но се отличава с голямо стандартно отклонение (Фиг. 19 а, Таблица 7). Затова беше изследвана хистограмата на $F_{470/400}$ отношението определено за MM пациентите и беше установено, че стойностите на този параметър могат да бъдат разпределени в три групи: група 1 ($F_{470/400} \sim 1.4$, за 50 % от случаите на MM), група 2 ($F_{470/400} \sim 2.14$, за 49 % от случаите на MM) и група 3 ($F_{470/400} \sim 3.06$, за 1 % от случаите на MM) (Таблица 7).

Беше проверено дали промените в $F_{470/400}$ корелират с основните биомаркери на заболяването, като концентрация на албумина и М протеина в кръвния серум. Въпреки че средните нива на албумина се увеличават, а на М протеина намаляват последователно в групите 1, 2 и 3, не беше установена статистически значима разлика между трите групи дефинирани на база на $F_{470/400}$ отношението (Таблица 7).

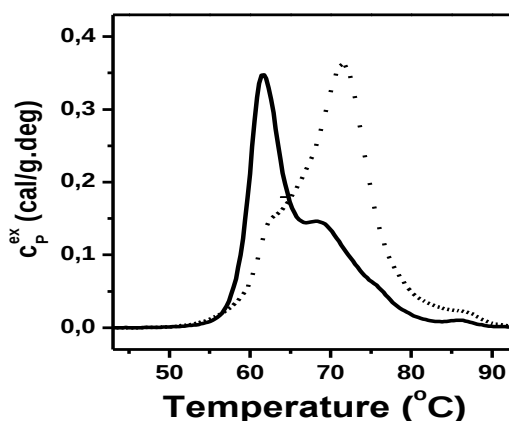
Също така беше изследвано дали измененията на F470/400 отношението корелират с промени в серумните термограми на пациентите. Установи се, че групирани на базата на калориметричните характеристики ММ случаи са разпределени неравномерно между F470/400 групите. Затова в рамките на една F470/400 група попадат пациенти, чиито термограми се различават силно по форма. Така два или три типични ДСК профила могат да се дефинират за всяка от F470/400 групите (типичен пример е представен на Фиг. 20) и съответно не се наблюдава корелация между формата на калориметричните профили и F470/400 параметъра.



Фиг. 19. F470/400 отношение, определено за контроли и IgM – ММ пациенти ($p=0,064$) (a). Разпределение на F470/400 между отделните IgM – ММ групи и контролите (група 1 ($p>0.05$), група 2 ($p>0.05$), група 3 ($p<0.05$)) (b).

Таблица 7. Характеристики на групите от IgM - ММ пациенти, дефинирани на базата на отношението F470/400, за сравнение са показани стойностите определени за здрави индивиди. Концентрациите на албумина (HSA) и парапротеина са показани в проценти от тоталното количество протеин в кръвния серум.

Група	Брой случаи	F470/400	HSA (%)	IgM парапротеин (%)	T _{FM} (°C)
Контроли	10	2.25±0.40	60.9±5.1	–	64.0±1.1
Група 1	22	1.42±0.14	43.5±13.6	31.0±14.9	69.1±1.8
Група 2	26	2.14±0.28	49.9±9.4	21.9±9.30	68.9±1.3
Група 3	4	3.06±0.22	56.6±4.0	11.7±3.60	69.2±0.8



Фиг. 20. Представителна термограма за здрави индивиди (плътна линия) и 65 % от случаите в група 1 ($F470/F400 \sim 1.42$) и 46% от група 2 ($F470/F400 \sim 2.14$) (пунктирна линия).

Проведеният статистически анализ на данните, получени от измерванията на флуоресценцията на NAD(P)H показва 0.5 чувствителност и 0.58 точност на теста, тоест много по-ниска чувствителност в сравнение с имунологичните (100 % от изследваните случаи имат IgM парапротеин) и калориметричните (100 % от изследваните случаи се характеризират с отместен T_{FM} в сравнение с контролите) тестове.

Ефективността на серумната NAD(P)H флуоресценция за случаите на IgM MM е подобна на тази за други изследвани ракови заболявания (Mikirova et al., 2003), но нашите изследвания доказаха, че ДСК подходът превъзхожда метода, базиран на NAD(P)H флуоресценция, като биофизична техника за диагностика на IgM MM случаи.

ОБОБЩЕНИЕ

Калориметричните профили (термограми) на кръвен серум/плазма са изключително комплексни поради припокриването на множество калориметрични преходи, съответстващи на стотици серумни протеини. ДСК профилите на пациенти с различни заболявания са съществено променени спрямо тези на здрави индивиди не само поради промяна на концентрацията на серумните протеини, но и поради модифициране на мрежата от молекулни взаимодействия и образуване на комплекси (протеини/лиганди), свързани със заболяването.

Получените посредством ДСК термограми са високо информативни по отношение на термодинамичните събития, възникващи в хода на взаимодействието между серумните протеини и биомаркери, свързани с промени в температурите на преходите на денатурация на албумина и имуноглобулините, специфичния топлинен капацитет на тези преходи, енталпията, средния център на тежестта на термограмата, както и във формата на термограмата. Измененията на тези параметри са индикация за настъпващите в протеома промени, което позволява използването на метода и за проследяване на развитието на болестта при пациенти, диагностицирани с онкохематологични заболявания.

Дисертационният труд е фокусиран върху определянето на калориметрични маркери за проследяване на пациенти с ММ, преди и след АТСК, както и на нетрансплантирани пациенти с ММ и WM по време на лечението им. Проследени са промените в калориметричните профили на кръвен серум от пациентите в различни точки на мониториране, а данните за калориметричните биомаркери са сравнени с клиничните параметри.

Като първа стъпка в настоящата работа бяха характеризирани типичните термодинамични профили на малка група от пациенти, диагностицирани с IgM ММ и WM, и беше характеризирана промяната им в хода на лечение на пациентите. Беше установено, че термограмите на IgM ММ и WM пациенти са сходни и силно повлияни от количеството моноклонални IgM молекули. Получените данни разкриха, че промяната във формата на ДСК профилите (отразена в статистическия параметър коефициент на корелация по Пиърсън, r) корелира с флуктуациите в нивата на моноклоналните IgM тежки/леки вериги (детектирани посредством Nevylite® тест) и демонстрираха, че тези два параметъра могат да бъдат използвани като комплементарни маркери за прогресията на заболяването.

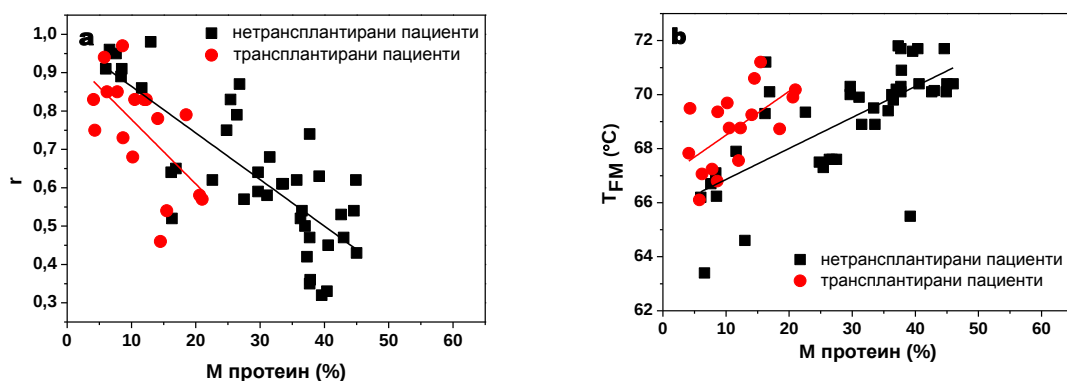
За да проучим по-обстойно връзката между калориметричните и имунологичните маркери, като следваща стъпка, изследвахме по-голяма кохорта пациенти в хода на тяхното лечение. Изследванията ни потвърдиха връзката между измененията в калориметричните параметри и вариациите в нивата на основния имунологичен маркер – нивото на М протеините при пациенти със секрция на IgG и IgM, докато корелация с нивото на свободните леки вериги не беше установена.

Тези резултати разкриха потенциала на ДСК подхода за регулярно мониториране на ММ пациенти в хода на лечението им, идентифициране на периоди на ремисия и повторна поява на заболяването.

При проследяването на трансплантирани пациенти с различен изотип ММ, както и ММ със секречия на свободни леки вериги и несекреторен ММ, установихме, че разликите в термодинамичното поведение на кръвните серуми от различни пациенти преди лечението и през периода на мониториране отразяват отговора на отделните пациенти на приложеното лечение и че хетерогенността на болестта се запазва и по време на лечението на заболяването. Показахме, че подобие в формата на термограмите, позицията на главния ендотермичен преход, центърът на тежестта на термограмите и появата на преход под 60 °C могат да бъдат използвани като калориметрични маркери, които показват наличие на парапротеини, моноклонални леки вериги и/или остатъчна болест. Проследявайки промяната в термограмите на кръвния протеом и имунологичните маркери на ММ (секреторен, FLC и NS ММ) и WM пациенти по време на продължителен период на мониториране потвърдихме, че статистическият показател r , т.е формата на калориметричния профил на кръвните серуми най-добре отразява клиничното състояние на секреторните ММ и WM пациенти. По този начин, статистическият показател r може да се използва като допълнителен параметър (калориметричен маркер) при оценката на обективното състояние на секреторните ММ и WM пациенти. Подобно заключение направихме и за пациенти с ММ, подложени на трансплантация на автоложни стволови клетки (Danailova et al., 2017).

Комбинирането на калориметричните и серологичните маркери дава възможност да се установи появата на ранни рецидиви след АТСК, да се регистрират моделите на поява на рецидиви при различните типове ММ и съответно да се подпомогне дизайна на схеми за мониториране на пациенти претърпяли АТСК.

Беше наблюдавано сходство в зависимостта на калориметричните и имунологичните маркери при трансплантирани и нетрансплантирани пациенти със секреторен ММ. Връзката между коефициента на корелация r и нивото на М протеина при трансплантираните и нетрансплантираните пациенти е сходна, както и корелацията между М протеина и T_{FM} (Фиг. 21).



Фиг. 21. Зависимост на промените на статистическия параметър, r (а), и средния център на тежестта на термограмата, T_{FM} (б), от концентрацията на имунологичния маркер М протеин (% от тоталното съдържание на протеини в кръвния серум) при трансплантирани (●) и нетрансплантирани (■) пациенти със секреторна форма на ММ.

Въпреки тези прилики, трябва да се отбележи, че след трансплантация концентрацията на М протеина в серума намалява най-много до около 20 % от тоталния протеин, докато при нетрансплантираните пациенти превишава тази стойност, което ясно показва позитивния ефект от трансплантацията. В потвърждение на това твърдение според статистическия тест на Wilcoxon областта на албумина в термограмите на трансплантирани пациенти се припокрива с тази на контролите, тоест албуминът запазва нативното си конформационно състояние при два пъти повече случаи отколкото при нетрансплантирани пациенти, където преходът му често е отместен в следствие от модифицирани междумолекулни взаимодействия.

За разлика от случаите на секреторен ММ, промените в калориметричните маркери, установени при случаите на несекреторен миелом (когато не се откриват биомаркери в кръвните серуми) не корелираха с имунологичните профили на изследваните пациенти. Затова факторите, които оказват влияние върху формата на термограмите при NS ММ случаи, остава да бъдат изяснени и в този момент не могат да бъдат ясно дефинирани калориметрични маркери за тези случаи.

В заключение, резултатите по дисертационния труд потвърждават безспорния потенциал на ДСК подхода за приложение в клиничната

практика като бърз, неинвазивен и информативен тест за стратификация и мониториране на пациенти с MM и WM. ДСК подходът може да бъде използван като комплементарно биоаналитично средство за наблюдение на индивидуалния отговор на пациенти с MM и WM в хода на тяхното лечение и съответно за разработването на протоколи за мониториране и за индивидуално лечение на тези заболявания.

ИЗВОДИ

1. Промените във формата на калориметричните профили на кръвен серум от пациенти, диагностицирани с различен изотип секреторен мултиплен миелом или Валденщрьом макроглобулинемия по време на тяхното лечение и след автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки, корелират с промените в нивото на основния имунологичен маркер , традиционно прилаган в клиничната практика – концентрация на парапротеини.
2. Калориметричните параметри: температура на основния преход (T_m^{mp}), среден център на тежестта на термограмата (T_{FM}), коефициент на корелация r (отразяващ сходството във формата на две термограми) и появата на преход при температура 56 – 58 °C могат да послужат като маркери за проследяване на статуса както на пациенти с мултиплен миелом след автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки, така и на нетрансплантирани пациенти по време на тяхното лечение.
3. Калориметричните профили на кръвен серум получен от пациенти с IgM MM и WM показват сходни характеристики дължащи се главно на наличието на моноклонални IgM парапротеини.
4. Въпреки че имунологичните маркери (отношение на κ/λ свободни леки вериги, албумин и β2-микроглобулин) са в норма по време на мониторирането за пациенти с несекреторен миелом, калориметричните параметри се отличават от типичните стойности за

зdravi индивиди, което най-вероятно се дължи на наличието на специфични, неустановени до момента, биомаркери за мултиплен миелом, които променят термодинамичните свойства на серумния протеом.

5. Установено е, че ДСК подходът превъзхожда по чувствителност метода базиран на NADP(H) флуоресценция за детекция на ракови заболявания.

СПРАВКА ЗА НАУЧНИТЕ ПРИНОСИ

1. За пръв път са характеризирани калориметричните профили на пациенти диагностицирани с мултиплен миелом със секретирание на IgM парапротеин и Валденщрьом макроглобулинемия. Демонстрирано е сходството в техните термограми, отразяващо близката природа на тези заболявания и е представена калориметрична класификация.
2. За пръв път е получена информация за термодинамичното поведение на серум от пациенти с мултиплен миелом след автоложна трансплантация на хемопоетични стволови клетки и по време на лечението на нетрансплантирани пациенти. Идентифицирани са калориметрични маркери за проследяване ефекта на лечение.
3. Потвърдено е, че ДСК методът е подходящ тест за мониториране на пациенти с несекреторен миелом, за който рутинните методи не регистрират отклонения в стойностите на имунологичните маркери от референтните.
4. Изследванията допринасят за валидирането на калориметричния подход като комплементарен метод за мониториране на ремисията/прогресията на мултиплен миелом и Валденщрьом макроглобулинемия, и за оценяване индивидуалния отговор на пациентите към приложеното лечение или към автоложна

трансплантация на хемопоеетични стволови клетки, който в бъдеще може да намери приложение в клиничната практика.

Публикации, включени в дисертационния труд

Danailova A., Dzhuliya Dz., Todinova S., Gartcheva L., Taneva S., Krumova S., Serum NAD(P)H fluorescence vs. serum proteome calorimetry for IgM multiple myeloma discrimination, J. of BioSci. & Biotech., 2015, SE/ONLINE: 49 – 53

Krumova S., Todinova S., Danailova A., Petkova V., Dimitrova K., Gartcheva L., Taneva S.G., Calorimetric features of IgM gammopathies. Implication for patient's diagnosis and monitoring, Thermochemica Acta, 2015, 615: 23 – 29

Danailova A., Todinova S., Dimitrova K., Petkova V., Guenova M., Mihaylov G., Gartcheva L., Krumova S., Taneva S., Effect of autologous stem-cells transplantation of patients with multiple myeloma on the calorimetric markers of the serum proteome. Correlation with the immunological markers, Thermochemica Acta, 2017, 655: 351 – 357

Todinova S., Krumova S., Danailova A., Petkova A., Guenova M., Mihaylov G., Gartcheva L., Taneva S.G., Calorimetric markers for monitoring of multiple myeloma and Waldenström's macroglobulinemia patients, European Biophysical Journal 2017, under revision

Забелязани цитирания

Krumova S., Todinova S., Danailova A., Petkova V., Dimitrova K., Gartcheva L., Taneva S.G., Calorimetric features of IgM gammopathies. Implication for patient's diagnosis and monitoring, *Thermochim. Acta.*, 2015, 615: 23 – 29

Garbett N., Brock G., Differential scanning calorimetry as a complementary diagnostic tool for the evaluation of biological samples, BBA - General Subjects, 2016, 5 : 981 – 989

Koynova R., Antonova B., Sezanova B., Tenchov B., Beneficial effect of sequential chemotherapy treatments of lung cancer patients revealed by calorimetric monitoring of blood plasma proteome denaturation, Thermochemica Acta, 2018, 659: 1 – 7.

Участия в научни форуми

1. XI – та Международна научна конференция на Съюза на учените Стара Загора, 4 – 5 юни 2015 г.

Постер: „Calorimetric features of IgM multiple myeloma and Waldenström macroglobulinemia”, Danailova A., Todinova S., Petkova V., Dimitrova K., Krumova S., Gartcheva L., Taneva S.

2. Юбилейна научна конференция на института по молекулярна биология към БАН, 5 – 6 октомври 2015 г., София.

Постер: "Differential scanning calorimetry for the monitoring of multiple myeloma patients after autologous stem cell transplantation", Danailova A., Todinova S., Gartcheva L., Krumova S., Taneva S.

3. 2nd National Conference for young researchers – Biosciences for better future, 30 – 31 октомври 2015 г., Пловдив.

Постер: „Serum NAD(P)H fluorescence vs. serum proteome calorimetry for IgM multiple myeloma discrimination”, Danailova A., Dzhonova D., Todinova S., Gartcheva L., Taneva S., Krumova S.

4. Младежка научна конференция „Клименови дни“, 19 – 20 ноември 2015 г., София.

Постер: „Differential scanning calorimetry for multiple myeloma types discrimination“, Danailova A., Todinova S., Garcheva L., Krumova S., Taneva S.

5. XXVI Международна научна конференция, посветена на 55 години от основаването на съюза на учените – Стара Загора, 2 – 3 юни 2016 г.

Постер: „Monitoring of non-secretory multiple myeloma patients“, Danailova A., Todinova S., Garcheva L., Krumova S., Taneva S.

6. Analytical and Nanoanalytical Methods for Biomedical and Environmental Sciences, 29 юни – 01 юли 2016 г., гр. Брашов, Румъния.

Постер: „Calorimetric Monitoring of Patients with Multiple Myeloma after Autologous Stem-Cells Transplantation“, Danailova A., Todinova S., Garcheva L., Krumova S., Taneva S.

7. Юбилейна Научна сесия „Биомедицина и качество на живот – младите в науката“, 26 – 27 юни 2017 г.

Доклад на тема: „Калориметрични маркери за мониториране на нетрансплантирани и подложени на автоложна трансплантация на стволови клетки пациенти с мултиплен миелом“, Danailova A., Krumova S., Todinova S., Garcheva L., Taneva S.

Участия в проекти

ДФНП 140/2016, Оценяване ефекта на автоложна трансплантация на стволови клетки върху статуса на пациенти с мултиплен миелом посредством диференциална сканираща микрокалориметрия