

Адрес: 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.
E-mail: lrcipr@211.ru.

Мирошников Павел Николаевич, научный сотрудник
ЦНИЛ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный
медицинский университет” Минздрава России.
Адрес: 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.
E-mail: miroshnikov@scpb.ru.

Дубровин Андрей Владимирович, научный сотрудник
ЦНИЛ ФГБОУ ВО “Новосибирский государственный
медицинский университет” Минздрава России.
Адрес: 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52.
E-mail: post_gem@mail.ru.

УДК 616-006.448:616-419-089.843

СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ ПРИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Л.П. Рыбакова, Л.Р. Алексанян, С.В. Грицаев, С.И. Капустин, С.С. Бессмельцев

ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства”, Санкт-Петербург
E-mail: forlussy@rambler.ru

THE STATE OF OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA DURING THE AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

L.P. Rybakova, L.R. Aleksanyan, S.V. Gritsaev, S.I. Kapustin, S.S. Bessmeltsev

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russian Federal Medico-biological Agency, St. Petersburg

Целью работы явилось изучение состояния окислительно-антиокислительной системы (ОС-АОС) у больных множественной миеломой (ММ) в ходе аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК). Обследовано 20 больных ММ (11 мужчин и 9 женщин, средний возраст – 49 лет), которым была проведена АутоТГСК после введения высокодозного мелфалана. Контрольную группу составили 50 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту группе больных. В плазме крови определяли уровень малонового диальдегида, активность супероксиддисмутазы и каталазы, а также содержание церулоплазмينا, в эритроцитах – содержание небелковых тиоловых групп. Состояние ОС-АОС больных ММ исследовали до и после режима кондиционирования, а также в период наибольшего снижения уровня лейкоцитов в периферической крови и при выходе больного из цитопении. В результате исследования установлено, что у больных ММ как до, так и в ходе проведения АутоТГСК имеется дисбаланс ОС-АОС. Уровень малонового диальдегида в процессе лечения изменялся незначительно и при выходе из цитопении оказался близким к норме. О напряженности в работе антиокислительной системы у больных ММ свидетельствует значительное увеличение в плазме крови уровня церулоплазмينا и активности каталазы, а также снижение содержания небелковых тиоловых групп в эритроцитах. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте встречаемости дисбаланса ОС-АОС у больных ММ и позволяют рассматривать его как один из возможных механизмов ухудшения течения посттрансплантационного периода при проведении АутоТГСК.

Ключевые слова: аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, множественная миелома, окислительно-антиокислительная система.

The aim of the study was to investigate the state of oxidant-antioxidant system (OS-AOS) in patients with multiple myeloma (MM) during the autologous hematopoietic stem cells transplantation (autoHSCT). We studied 20 patients (11 men and 9 women, mean age 49 years) who followed autoHSCT after high-dose melphalan. The control group consisted of 50 age- and sex-matched healthy persons. The plasma levels of malonic dialdehyde and ceruloplasmin as well as activities of superoxide dismutase and catalase were measured by standard biochemical techniques. In erythrocytes, the level of non-protein thiol groups was studied. The state of OS-AOS was investigated in each patient four times: before and after conditioning with melphalan, at the moment of maximal leukocyte decrease and after complete reconstitution from cytopenia. We have found the features of impaired balance in OS-AOS in MM patients before as well as in course of autoHSCT. The level of malonic dialdehyde in MM patients was not significantly different from that in the control group. At the same time, ceruloplasmin plasma level as well as catalase activity were significantly increased in patient group ($p < 0.05$), whereas the level of non-protein thiol groups was decreased in MM ($p < 0.05$). The results of our study have shown, that an imbalance of OS-AOS is frequently seen in MM patients and, possibly, could influence the course of autoHSCT.

Key words: autologous stem cells transplantation, multiple myeloma, oxidant-antioxidant system.

Введение

Множественная миелома (ММ) является одним из наиболее распространенных злокачественных В-клеточных лимфолифферативных заболеваний и характеризуется клональной пролиферацией атипических плазматических клеток в костном мозге, реже – в экстрамедуллярных очагах, синтезирующих моноклональные иммуноглобулины [1]. Для ММ свойственна значительная степень гетерогенности клинических проявлений, а также молекулярно-биологических механизмов, лежащих в основе ее этиопатогенеза [1–4]. К настоящему времени достигнуты большие успехи в понимании роли генетической предрасположенности и хромосомной нестабильности, химических, иммунологических, инфекционных, радиологических и других факторов в развитии ММ [3, 4].

Свой вклад в патогенез онкогематологических заболеваний могут вносить и особенности состояния микроокружения костного мозга, а также эпигенетические факторы, в частности, несбалансированность окислительно-антиокислительной системы (ОС-АОС) [5–8]. Гиперпродукция свободных радикалов на фоне ослабления защитных систем организма, в том числе антиокислительной системы (АОС), может привести к повреждению клеточных мембран и структуры белков, особенно гликозилированных, а также нуклеиновых кислот и углеводов [9, 10]. Кроме того, активация окислительных процессов на фоне истощения потенциала АОС может провоцировать развитие и/или ухудшать течение инфекционных осложнений, уменьшать эффективность трансфузий компонентов крови, снижать качество жизни [11–13]. Таким образом, содержание и активность биоантиоксидантов, к числу которых относятся различные ферменты, неферментные белки и низкомолекулярные соединения, могут оказывать влияние не только на риск злокачественной трансформации, но и на особенности течения патологического процесса и постцитостатического периода, включая посттрансплантационный.

В настоящее время стандартным методом лечения молодых пациентов (≤ 65 лет) с ММ признана аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК). Причем наиболее высокие результаты АутоТГСК наблюдаются у больных, получавших в индукционной терапии новые лекарственные препараты (талидомид, бортезомиб, леналидомид) и достигших не менее чем очень хорошего частичного ответа, что приво-

дит к существенному увеличению общей выживаемости [1, 14]. Однако работы, отражающие влияние данного вида лечения на динамику показателей ОС-АОС у больных ММ, практически отсутствуют. В то же время, возможность коррекции развивающихся нарушений посредством назначения лекарственных препаратов, обладающих антиокислительной способностью, делает данную проблему весьма актуальной. В связи с этим была разработана научно-исследовательская работа, выполнение которой предполагает несколько этапов.

Целью первого, пилотного, этапа, результаты проведения которого представлены в данной статье, было изучение показателей ОС-АОС у больных ММ для выявления динамического изменения отдельных ее составляющих при проведении АутоТГСК. На основании полученных данных предполагается разработка протокола обследования больных (сроки заготовки биологических образцов, объем лабораторных исследований) уже на следующем, втором этапе, при проведении которого планируется получить данные о сопряженности дисбаланса ОС-АОС с отдельными клинико-гематологическими показателями.

Материал и методы

В работе исследовалось состояние ОС-АОС у 20 больных ММ (11 мужчин и 9 женщин, средний возраст – 49 лет (диапазон от 27 до 65 лет)) в процессе лечения с помощью аутоТГСК. Диагноз ММ верифицировали по критериям ВОЗ с дополнениями Международной рабочей группы по миеломе [1]. До проведения АутоТГСК больные получали индукционную терапию с обязательным включением бортезомиба: VD (бортезомиб + дексаметазон), CVD (циклофосфамид + бортезомиб + дексаметазон), PAD (бортезомиб + дексаметазон + доксорубин). Режим кондиционирования (предтрансплантационной подготовки) включал введение мелфалана в дозе 140–200 мг/м², что определялось возрастом больного и коморбидностью и, прежде всего, функциональным состоянием. Контрольную группу составили 50 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту группе больных.

Оценку состояния ОС-АОС в группе больных ММ проводили в следующих 4-х точках: 1) накануне введения мелфалана; 2) на следующий день после введения мелфала-

Таблица

Показатели ОС-АОС у больных ММ на разных этапах проведения АутоТГСК

Исследуемая группа	Показатели ОС-АОС					
	МДАмкмоль/л	СОДу.е.	КАТу.е.	ЦПг/л	НТГммоль/л	СОД/КАТ
Контрольная	11,0±0,8	39,0±2,0	1,9±0,2	0,40±0,03	0,34±0,06	21,0±2,0
Больные						
До режима кондиционирования	12,4±0,6	39,8±2,8	3,8±0,3*	0,60±0,05*	0,20±0,07*	12,6±3,1
После режима кондиционирования (следующий день)	13,5±0,5	40,7±1,9	4,0±0,3*	0,60±0,06*	0,16±0,05*	12,0±3,6
Максимальное снижение уровня лейкоцитов в крови	13,0±0,5	36,0±0,5*	2,1±0,2	0,70±0,03*	0,15±0,04*	23,7±0,9
Выход из цитопении	12,6±0,6	33,2±0,4*	2,5±0,2*	0,70±0,02*	0,20±0,05*	24,3±1,1

Примечание: у.е. – условные единицы; * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

на; 3) в период максимального снижения уровня лейкоцитов в периферической крови (медиана 5+ день); 4) при выходе из цитопении: уровень лейкоцитов $> 1 \times 10^9/\text{л}$ и абсолютное число нейтрофилов $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$ (медиана 10+ день).

Для характеристики ОС-АОС у больных ММ исследовали следующие показатели. В плазме крови определяли содержание малонового диальдегида (МДА) – продукта вторичной перекисидации липидов, и ряда показателей АОС – активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ), содержание церулоплазмينا (ЦП). В эритроцитах проводилось исследование уровня небелковых тиоловых групп (НТГ). Содержание МДА определяли колориметрическим методом [15]. Активность суммарной СОД плазмы оценивали по степени торможения реакции окисления кверцетина [15]. Активность каталазы в плазме крови определяли на основании ее способности разлагать перекись водорода, о чем судили по количеству неутрилизованной H_2O_2 , образующей стойкий окрашенный комплекс с солями молибдата аммония [17]. Содержание церулоплазмينا измеряли по степени окисления фенилендиаминдигидрохлорида в присутствии этого антиоксиданта [18]. Определение уровня НТГ в эритроцитах было основано на способности низкомолекулярных тиоловых соединений при взаимодействии с дитионитробензойной кислотой образовывать стойкое окрашенное соединение [15]. Статистическая обработка полученных данных проводилась методом вариационной статистики с определением средней величины M , ее средней ошибки m . Математическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программного обеспечения Statistica v.7.0, Microsoft Excel для Windows XP. Статистическая значимость различий оценивалась с помощью t -критерия Стьюдента. Различия между отдельными показателями принимали значимым при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты изучения показателей состояния ОС-АОС в процессе лечения больных ММ представлены в таблице.

Следует отметить, что у больных ММ наблюдались незначительные отклонения от нормы показателя МДА, даже в состоянии глубокой цитопении. Активность СОД в процессе лечения изменялась неоднозначно, но характерно, что даже при выходе из цитопении она была снижена в среднем на 15%. В то же время, активность каталазы – фермента, который удаляет из клетки перекись водорода при наличии ее в очень высокой концентрации, оставалась значительно повышенной даже при выходе больного из цитопении, что косвенно может свидетельствовать об избыточном присутствии перекиси водорода по окончании лечения. Нужно помнить, что каталазная реакция может быть источником активных форм кислорода, так как около 0,5% кислорода образуется в этой реакции в возбужденном синглетном состоянии [10].

Характерным практически у всех обследованных больных до, в процессе и после окончания лечения было значительное (на 40–60%) снижение содержания НТГ эритроцитов. Известно, что более 90% НТГ составляет глутатион [10]. Это свидетельствует о глубоком истощении

данного антиоксиданта первичной линии защиты от активных форм кислорода. Глутатион – это главный пептидный серосодержащий компонент в организме, принимающий участие в многочисленных реакциях. Глутатион выступает как коэнзим многих биохимических реакций, восстанавливает железо, переводя его из трехвалентной в двухвалентную форму, способен связывать ионы меди. Дефицит глутатиона снижает скорость синтеза ДНК и белков [10, 15]. К наиболее важным функциям глутатиона относятся детоксикация перекиси и транспорт аминокислот через мембрану. В этой связи, содержание НТГ в эритроцитах можно рассматривать как один из важных биохимических маркеров в оценке состояния ОС-АОС в ходе лечения больных ММ. Уровень НТГ был значительно ниже в группе больных, чем у здоровых лиц, причем как до лечения, так и в процессе проведения аутоТТСК, и не достигал показателей нормы.

Поскольку антиоксиданты выполняют свою защитную функцию, работая согласованно, усиливая, а иногда и ослабляя действие друг друга, способствуя сохранению активности и структурной целостности молекул, участвующих в этой системе, то опираясь на полученные данные, можно засвидетельствовать выраженный дисбаланс функционирования АОС, что, безусловно, сказывается на работе системы ОС-АОС в целом.

Полученные данные позволяют сформулировать основные задачи следующего этапа исследования, включая такие, как поиск ассоциации функционального состояния ОС-АОС с частотой и тяжестью инфекционных осложнений, эффективностью трансфузий компонентов крови, скорости приживления трансплантата и состоянием качества жизни. Наряду с этим результаты исследования свидетельствуют о целесообразности расширения частоты исследований у отдельных больных путем дополнительного исследования состояния ОС-АОС через 1 месяц после АутоТТСК.

Выводы

Полученные в работе результаты свидетельствуют о высокой частоте встречаемости нарушений состояния ОС-АОС у больных ММ. Дисбаланс в функционировании этой системы не устраняется полностью в процессе лечения больных ММ с использованием аутоТТСК. Вопрос о необходимости и методах возможной коррекции ОС-АОС у больных ММ, в частности, при проведении аутоТТСК, требует дополнительного изучения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Бессмельцев С.С., Абдулкадыров К.М. Множественная миелома : рук. для врачей. – М. : МК, 2016. – 514 с.
2. Рукавицын О.А., Поп В.П. Множественная миелома. Гематология : национальное руководство. – Раздел 5, гл. 40. – С. 550–580.
3. Павлова А.А., Бубнова Л.Н., Соколова Ю.В. и др. Роль полиморфизма гена *TGF-β1* в развитии множественной миеломы // Клиническая онкогематология. – 2015. – Т. 8, № 3. – С. 274–280.

4. Бессмельцев С.С. Множественная миелома // Вестник гематологии. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 6–39.
5. Bessmeltsev S., Rugal V. Stromal microenvironment and stem cells niches in multiple myeloma // Hematologica (15th Congress of the European Hematology Association, Spain, Barcelona, June, 10–13, 2010, Abstract Book). – 2010. – P. 569–570.
6. Zhou F.L., Zhang W.G., Wei Y.C. et al. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285 (20). – P. 15010–15015.
7. Ames B.N., Gold L.S., Willet W.C. The causes and prevention of cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 5258–5265.
8. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. и др. Современные представления о диагностике и лечении истинной полицитемии // Вестник гематологии. – 2015. – Т. 11, № 1. – С. 4–46.
9. Dell'Anna M.L., Ottaviani M., Bellei B. et al. Membrane lipid defects are responsible for the generation of reactive oxygen species in peripheral blood mononuclear cells from vitiligo patients // J. Cell Physiol. – 2010 – Vol. 223. – P. 187–193.
10. Путилина Ф.Е., Галкина О.В., Ещенко Н.Д. и др. Свободнорадикальное окисление. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2008. – 161 с.
11. Davaasambuu B., Gritsaev S.V., Ribakova L.P. et al. The effectiveness of platelets transfusions and oxidative stress in patients with acute myeloid leukemia during induction chemotherapy // Haematologica. – 2014. – Vol. 99 (Suppl. 1). – P. 761–762.
12. Рыбакова Л.П., Алексанян Л.Р., Даваасамбуу Б. и др. Состояние окислительно-антиокислительной системы крови больных острым миелобластным лейкозом при введении тромбоцитного концентрата // Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины: сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 6–7 октября 2015 г., г. Киров. – С. 342–345.
13. Salganik R.I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population // J. Am. Coll. Nutr. – 2001. – Vol. 20. – P. 464S–472S.
14. Gay F., Larocca A., Wijermans P. et al. Complete response correlates with long-term progression-free and overall survival in elderly myeloma treated with novel agents: analysis of 1175 patients // Blood. – 2011. – Vol. 117. – P. 3025–3031.
15. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. – СПб., 2000. – 103 с.
16. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, №2. – С. 88–91.
17. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–48.
18. Ravin H., Harvard M. Rapid test for hepatolenticular degeneration // Lancet. – 1956. – Vol. 1. – P. 726–727.

Поступила 06.12.2016

Сведения об авторах

Рыбакова Лариса Петровна, докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства”.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

E-mail: forlussy@rambler.ru.

Алексанян Лусинэ Робертовна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биохимии ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства”.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

E-mail: aleksanian-lr@yandex.ru.

Грицаев Сергей Васильевич, докт. мед. наук, главный научный сотрудник клинического отделения химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства”.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

E-mail: gritsaevsv@mail.ru.

Капустин Сергей Игоревич, докт. биол. наук, руководитель лаборатории биохимии ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства”.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

E-mail: kapustin.sergey@mail.ru.

Бессмельцев Станислав Семенович, докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ “Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства”.

Адрес: 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16.

E-mail: bsshem@hotmail.com.