

Н.Н. Третьяк  
 М.Ю. Аношина  
 О.В. Мошинская  
 М.В. Яговдик  
 О.В. Басова  
 В.Н. Мнищенко  
 А.М. Вакульчук

Институт гематологии и  
 трансфузиологии  
 АМН Украины, Киев, Украина

## КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ КАК ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

### Ключевые слова:

множественная миелома,  
 эритроциты, плазма крови,  
 перекисное окисление липидов,  
 прогностические критерии.

**Резюме.** Представлены данные о метаболических нарушениях на клеточно-молекулярном уровне у больных с множественной миеломой (ММ): прогрессирование заболевания сопровождается активизацией процессов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов в эритроцитах и плазме крови. Установлены биохимические прогностические критерии течения ММ, позволяющие прогнозировать длительность жизни больных сразу после установления диагноза, более точно определить группу риска и назначить адекватную терапию. Выявлена множественная корреляционная зависимость между выживаемостью больных с ММ и показателями изолированных двойных связей (ИДС), диеновых (ДК) и оксодиеновых конъюгатов (ОДК) при перекисидации фосфолипидов в плазме крови. Независимо от наличия сопутствующей патологии длительность жизни больных с ММ с момента установления диагноза достоверно меньше при высоких исходных показателях ИДС, ДК, ОДК.

### ВВЕДЕНИЕ

Больные с множественной миеломой (ММ) составляют около 10% всех взрослых больных с гемобластозами (в среднем 3–4 случая на 100 000 населения). Несмотря на безусловные успехи в лечении, ММ остается тяжелым заболеванием с высокой летальностью. Большинство больных хорошо отвечают на стандартные цитостатические программы, но у некоторых развивается первичная лекарственная резистентность, а также отмечено агрессивное течение болезни (около 30%). Эти больные составляют группу риска.

Ранняя диагностика и прогнозирование течения болезни дают возможность избежать использования неэффективных стандартных программ химиотерапии (ХТ), неоправданное применение которых только ухудшает предпосылки для проведения комбинированной ХТ [1, 3, 4, 7]. Известно несколько способов прогнозирования течения ММ [4–6, 8, 9]. Для этого определяют стадию заболевания по Durie — Salmon и такие лабораторные критерии, как степень плоидности и пролиферативная активность плазматических клеток, уровень интерлейкинов-2 и -6, экспрессия их рецепторов. Известными биохимическими показателями для прогнозирования течения ММ являются концентрация  $\beta_2$ -микроглобулина и активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови, но эти показатели во многом зависят от функционального состояния печени и почек.

На современном этапе при поиске новых информативных прогностических критериев, в том числе биохимических, большое внимание уделяют изучению нарушений клеточно-молекулярных механизмов, в частности процессов свободнорадикального окисления липидов. Предполагается, что установление связи течения патологического процесса с нарушением перекисного окисления липидов (ПОЛ), данные о количественном содержании первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов липоперекисидации сделают более направленной и обоснованной коррекцию метаболических нарушений и повысят точность оценки адекватности программ лечения больных.

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 54 больных с ММ (26 мужчин и 28 женщин), средний возраст которых составил 61 год. У 35 и 16 больных соответственно установлена IIА и IIIА стадии по Durie—Salmon (уровень креатинина в сыворотке крови ниже 180 мкмоль/л), у 1 — IБ и 2 — IIБ стадия ММ (уровень креатинина выше 180 мкмоль/л). Контрольную группу составили 28 практически здоровых доноров.

Свободнорадикальное окисление липидов изучали в эритроцитах и плазме крови больных с ММ с помощью ранее разработанного метода [2]. Оптическую плотность каждой фазы экстрагированных

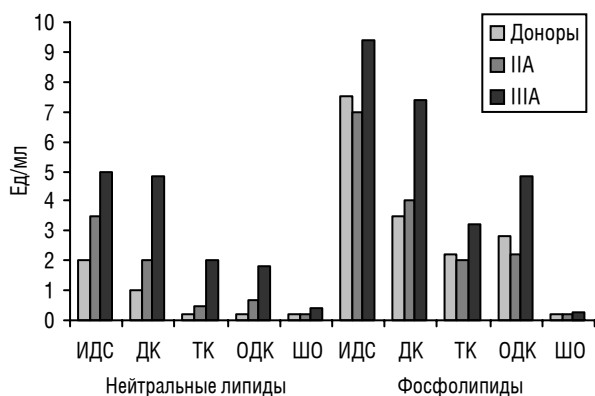
## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

липидов измеряли на спектрофотометре СФ-16 против соответствующего контроля при длине волны 220 нм —  $E_{220}$ , что отражает концентрацию изолированных двойных связей (ИДС) в ненасыщенных липидах, являющихся субстратами ПОЛ. Образование и распад гидроперекисей (первичных молекулярных продуктов липопероксидации) регистрировали по характерному максимуму поглощения в УФ-спектре: моногидроперекисей — диеновых конъюгатов (ДК) — при длине волны 232 нм —  $E_{232}$ , дигидроперекисей — триеновых конъюгатов (ТК) — при 268 нм —  $E_{268}$ . Оптическая плотность при длине волны 278 нм —  $E_{278}$  отображала содержание вторичных продуктов ПОЛ — оксодиеновых конъюгатов (ОДК). Дополнительно определяли концентрацию конечных продуктов ПОЛ — соединений типа шиффовых оснований (ШО) — при длине волны 400 нм  $E_{400}$ . В гептановой фазе определяли продукты перекисидации нейтральных липидов, а в изопропанольной фазе — фосфолипидов. Отношения  $E_{232}/E_{220}$ ,  $E_{278}/E_{220}$  и  $E_{400}/E_{220}$  показывают относительное содержание соответственно первичных, вторичных и конечных молекулярных продуктов липопероксидации.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ «Statgraf» (V.2.6., USA) с использованием программ: «Summary Statistics», «Correlation analysis and regression analysis», «Cluster analysis». Для статистического сравнения двух совокупностей применяли тест Стьюдента, для выявления связей между явлениями — дисперсионный анализ с определением коэффициента корреляции ( $r$ ). Анализ выживаемости больных с ММ проводили по методу Kaplan — Meier.

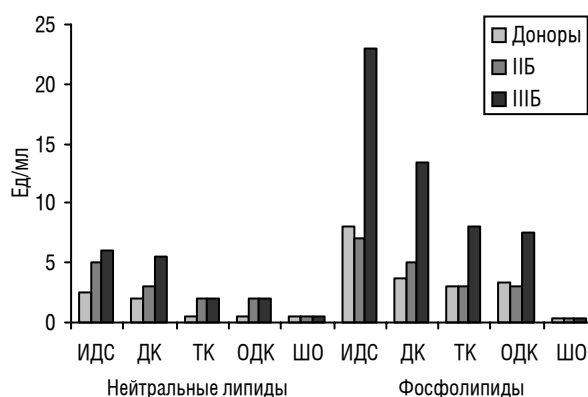
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с ММ установлена активизация процессов свободнорадикального окисления липидов. При перекисидации нейтральных липидов плазмы крови отмечается значительное повышение уровня ИДС, ДК, ТК, ОДК. Так, у больных с ММ стадии IIIA их концентрация возрастала в 1,2–6 раза (рис. 1), а при IIIБ стадии — в 3,8–7,4 раза по сравнению с контро-



**Рис. 1.** Содержание молекулярных продуктов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов в плазме крови больных с ММ IIA, IIIA стадии

лем (рис. 2). При перекисном окислении фосфолипидов установлено повышение их уровня в 1,3–3,4 раза при IIIA стадии ММ и в 3,1–4,8 раза при IIIБ стадии. Это может быть связано с выходом продуктов ПОЛ из тканей, в первую очередь из печени, функциональное состояние которой при ММ значительно изменяется, а также, возможно, со снижением антиоксидантной активности плазмы крови больных. Отмечено повышение ( $p < 0,05$ ) относительного содержания первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ: соответственно  $0,714 \pm 0,044$ ;  $0,432 \pm 0,013$  и  $0,031 \pm 0,002$  при  $0,455 \pm 0,014$ ;  $0,318 \pm 0,012$  и  $0,011 \pm 0,0008$  у доноров. У больных с ММ в терминальной стадии наблюдается так называемый Ребаунд-эффект — резкое снижение (ниже контрольных величин в 2–7 раз) концентрации молекулярных продуктов перекисного окисления фосфолипидов плазмы крови.



**Рис. 2.** Содержание молекулярных продуктов перекисного окисления нейтральных липидов и фосфолипидов в плазме крови больных с ММ IIБ, IIIБ стадии

Установлена значительная активизация процессов ПОЛ и в эритроцитах. При перекисидации нейтральных липидов у больных с ММ IIA стадии содержание ИДС повышается в 12,9 раза, ДК — в 13,8 раза, ТК и ОДК — более чем в 4,5 раза, в ШО — в 1,6 раза. При ММ III стадии концентрация данных продуктов липопероксидации изменяется соответственно в 18,9; 20,1; 6,0; 6,5 и 1,7 раза. При перекисном окислении фосфолипидов отмечены подобные закономерности, но выраженные в меньшей степени: в 1,7–3,2 раза в зависимости от стадии ММ.

Увеличение отношения ДК/ТК в 3,3 раза, ДК/ОДК (степени окисления жирных кислот) — в 2,7 раза и снижение индекса окисления (отношения ТК/ОДК) до  $0,824 \pm 0,021$  при  $1,15 \pm 0,025$  ( $p < 0,05$ ) у доноров указывает на изменение метаболизма липидов и значительную активизацию ПОЛ, особенно у больных с ММ III стадии, а также свидетельствует об ускоренной утилизации первичных молекулярных продуктов липопероксидации, менее стойких к окислению, чем вторичные продукты ПОЛ. Повышение коэффициентов распределения ДК, ТК, ОДК и ШО (отношение сходных показателей в эритроцитах и плазме крови, характеризующее степень выраженности нарушения обменных процессов) при перекисидации фосфолипидов свидетельствует о нарушении

обменных функций и накоплении в эритроцитах продуктов ПОЛ. При перекисном окислении нейтральных липидов снижение коэффициента распределения ОДК на фоне их высокого содержания в плазме крови указывает также на нарушение структурной целостности мембран эритроцитов.

Таким образом, у больных с ММ выявлены значительные метаболические нарушения на клеточно-молекулярном уровне, что подтверждает данные исследований, проведенных другими авторами [9–11]. Определение молекулярных продуктов ПОЛ в эритроцитах и плазме крови больных указывает на универсальный механизм повреждения. Прогрессирование заболевания сопровождается активизацией в эритроцитах и плазме крови процессов перекисного окисления как нейтральных липидов, так и фосфолипидов.

Из обследованной группы были выделены 30 больных с ММ, диагноз которым был установлен впервые. Результаты, полученные при определении ПОЛ, соотносились с длительностью их жизни. При перекисидации фосфолипидов плазмы крови она оказалась достоверно ниже при высоких исходных показателях ИДС ( $r = -0,681$ ,  $p < 0,05$ ), ДК ( $r = -0,655$ ,  $p < 0,05$ ), ОДК ( $r = -0,604$ ,  $p < 0,05$ ). Установлена множественная корреляционная зависимость между выживаемостью больных, у которых впервые была диагностирована ММ, и показателями ИДС, ДК, ОДК при перекисидации фосфолипидов в плазме крови ( $r = 0,687$ ,  $p < 0,03$ ). Чем более высокими были значения этих показателей, тем более короткой была длительность их жизни (таблица, рис. 3, 4). В соответствии с показателями ИДС, ДК, ОДК больных можно было подразделить на две группы. В 1-ю группу вошли 20 больных, у

Таблица

Критерии прогнозирования течения ММ					
Группа обследованных	Медиана выживаемости, мес	Средний возраст больных, лет	Содержание молекулярных продуктов перекисного окисления фосфолипидов в плазме крови, Е/мл		
			ИДС	ДК	ОДК
Контрольная	—	—	$7,39 \pm 0,53$	$3,36 \pm 0,27$	$2,32 \pm 0,02$
1-я	34,5	57,8	$5,55 \pm 0,46^*$	$3,61 \pm 0,31$	$2,63 \pm 0,26$
2-я	3	63,4	$10,12 \pm 1,02^{**}$	$6,94 \pm 1,02^{**}$	$4,29 \pm 0,64^{**}$

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой; \*\*  $p < 0,05$  по сравнению с 1-й группой

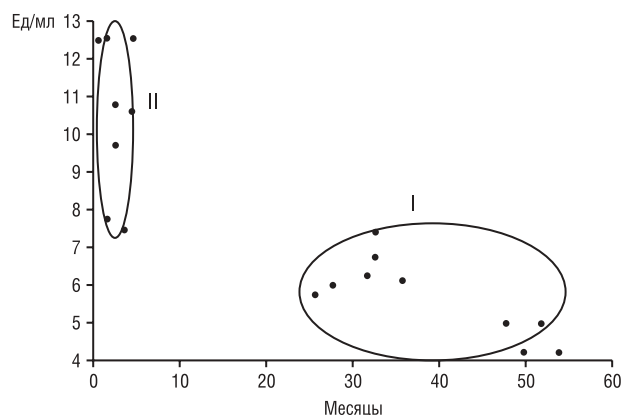


Рис. 3. Корреляция продолжительности жизни больных с ММ и концентрации ИДС (субстратов ПОЛ): I — больные 1-й группы; II — больные 2-й группы

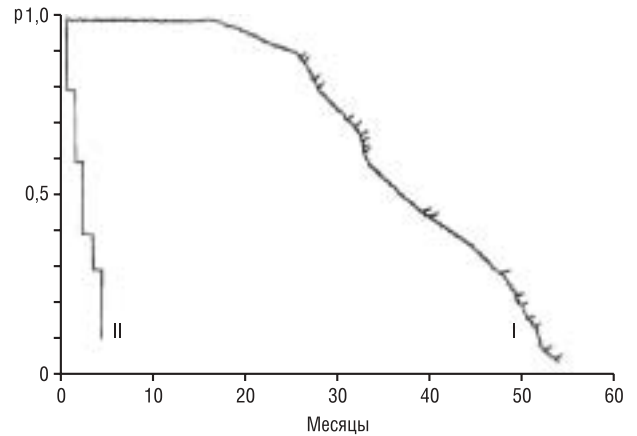


Рис. 4. Продолжительность жизни больных с ММ по Kaplan (в мес от момента установления диагноза): I — больные 1-й группы; II — больные 2-й группы

которых концентрация продуктов перекисидации фосфолипидов плазмы крови была в пределах нормальных величин. Во 2-ю группу включены 10 больных с высокими значениями этих показателей. Независимо от наличия сопутствующей патологии, в том числе нарушений функции почек, при исходной концентрации ИДС, ДК и ОДК соответственно выше 9, 6,6 и 4,5 Е/мл больные, несмотря на проводимое лечение, погибали в первые 3 мес. У больных с показателями, близкими к норме (ИДС — 4–7, ДК — 2,5–4,5 и ОДК 1,9–3,4 Е/мл), медиана выживаемости составляла 47 мес. Как установлено в результате проведенного нами исследования, у 30% больных с ММ прогноз был неблагоприятным, что соответствует данным, приведенным в доступной литературе [4].

Таким образом, предложенные новые биохимические прогностические критерии позволяют прогнозировать течение заболевания и длительность жизни больных с ММ непосредственно после установления диагноза. Подобный подход помогает более точно определять группу риска и соответственно этому назначать адекватную терапию.

## ЛИТЕРАТУРА

- Абдулкадыров КМ, Рукавицын ОА, Бессмельцев СС и др. Морфологическая характеристика структур кроветворного микроокружения у больных множественной миеломой. Гематол трансфузиол 1996; 41: 13–4.
- Аношина МЮ, Лановенко ИИ. Оценка свободнорадикального окисления липидов в эритроцитах и плазме крови. Физиол журн 1994; 40: 51–6.
- Барлоги Б, Эпштейн Дж, Сельваньягам П и др. Плазмноклеточная миелома. II. Новое в диагностике и лечении заболевания. Гематол трансфузиол 1992; 37: 33–9.
- Яковлева СВ. Значение исследований лактатдегидрогеназы и  $\beta_2$ -микроглобулина сыворотки крови для оценки прогноза и выбора терапии при множественной миеломе: [Автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М., ПОЛИПК, 1995. 19 с.
- Bataille R, Boccadoro M, Klein B. C-reactive protein and serum  $\beta_2$ -microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system. Blood 1992; 80: 733–7.
- Klein B, Zhang XG, Lu ZY. Interleukin-6 in human multiple myeloma. Blood 1995; 85: 863–72.
- Malpas JS, Bergsagel DE, Kyle RA. Myeloma. Biology and management. Oxford: Oxford Med Publ 1995. 379 p.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

8. Mouropoulos LA, Dimopoulos MA, Smith TL. Prognostic-significance of magnetic-resonance-imaging in asymptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 251–6.

9. Pulkki K, Pelliniemi TT, Rajamaki A. Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1996; **92**: 370–37.

10. Sasagawa T, Okita M, Murakami J, *et al.* Abnormal serum lyso-phospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 1999; **34**: 17–21.

11. Zima T, Spicka I, Stipek S, *et al.* Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in patients with multiple myeloma. *Neoplasma* 1996; **43**: 69–73.

### **CONCENTRATION OF PRODUCTS OF PEROXIDE OXIDATION OF PHOSPHOLIPIDES IN THE BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA AS A PROGNOSTIC CRITERION OF THE COURSE OF DISEASE**

*N.N. Tretiak, M. Yu. Anoshina,  
O. V. Moshynska, M. V. Yagovdick, O. V. Basova,  
V.N. Mnishenko, A.M. Vakulchuk*

**Summary.** *In this study we present data showing metabolic cellular-molecular disorders in patients with multiple*

*myeloma (MM). The progress of disease is accompanied by an activation of the processes of phospholipid and neutral lipid peroxidation in erythrocytes and plasma. New independent biochemical criteria of disease prognosis were determined. These criteria may be used to predict the survival of MM patients at diagnosis, help to determine the risk-group, and choose the right method of treatment. Multiple correlation was found between the survival of MM patients and the plasma concentrations of phospholipid peroxidation products, isolated double bonds (IDB), dienic (DC) and oxodienic conjugates (ODC). The life expectancy was substantially decreased in patients with increased levels of IDB, DC and ODC, irrespective of the concomitant pathology.*

**Key Words:** multiple myeloma, erythrocytes, plasma, lipid peroxidation, prognosis.

**Адрес для переписки:**

Аношина М.Ю.

04060, Киев, ул. М. Берлинского, 12

Институт гематологии и трансфузиологии АМН Украины, отделение гематологии для взрослых