

УДК 535.371

**АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ОСНОВНЫХ
ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ
С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ И ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДИРОВАНИЯ**

Е.В. КОРОЛИК, А.А. ИВАНОВ, Н.И. ИНСАРОВА, О.М. МОРОЗОВА*,
Н.Ф. МИЛАНОВИЧ*, А.Л. УСС*

*Белорусский Государственный Медицинский Университет
Дзержинского, 83, г. Минск, 220116, Беларусь*

**Республиканский центр гематологии и трансплантации костного мозга
Семашко, 8, г. Минск, 220089, Беларусь*

Поступила в редакцию 22 ноября 2016

Методом флуоресцентного зондирования установлено, что у пациентов с острым миелобластным лейкозом при проведении им высокодозной химиотерапии происходят конформационные изменения молекулы альбумина, а в посттрансплантационный период после проведения им ТГСК наблюдается уменьшение воспалительного процесса, что является благоприятным прогнозом.

Ключевые слова: флуоресцентное зондирование, лейкоз, высокодозная химиотерапия, гемопоэтические стволовые клетки, липопротеины, α -1-кислый гликопротеин.

Введение

Лейкоз – это заболевание, характеризующееся трансформацией определенных кроветворных клеток в злокачественные, неограниченное размножение которых приводит к замещению ими нормальных клеток костного мозга и очень высокому содержанию в крови измененных лейкоцитов. Современные подходы к лечению лейкозов включают стандартную, высокодозную химиотерапию и трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, что позволяет достичь благоприятного результата.

Развитие ряда тяжелых заболеваний, в том числе и лейкоза, сопровождается образованием и накоплением в жидких средах организма разнообразных токсических субстанций. Наиболее адекватным и информативным подходом к диагностике эндогенной интоксикации является тестирование функционального состояния основных транспортных систем плазмы крови, осуществляющих сорбцию и перенос гидрофобных метаболитов и лекарственных препаратов в организме. В настоящее время для оценки степени эндогенной интоксикации организма пациента по функциональному состоянию белков плазмы крови используется метод флуоресцентного зондирования, который является наиболее перспективным для изучения процесса функционирования белков плазмы крови при эндогенной интоксикации [1–3].

Цель работы – исследование методом флуоресцентного зондирования функционального состояния основных транспортных систем плазмы крови – сывороточного альбумина человека (ЧСА), липопротеинов (ЛП), α -1-кислого гликопротеина (α -1-КГП) – больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и хроническим миелолейкозом (ХМЛ), в комплекс лечебных мероприятий которым включены высокодозная химиотерапия (ВХТ) и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Материалы и методы

В работе были исследованы образцы плазмы крови здоровых доноров и больных с ОМЛ и ХМЛ, в комплекс лечебных мероприятий которым были включены высокодозная химиотерапия и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

В качестве консерванта плазмы крови был использован гепарин. Все растворы готовились в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH = 7,4 со 100 мМ NaCl. Спектры зондовой флуоресценции регистрировались на спектрофлуориметре SFL-1211A. В работе использовался набор флуоресцентных зондов: анионный – 1-анилинонафталин-8-сульфонат (АНС), который в плазме крови взаимодействует, в основном, с ЧСА (концентрация зонда 65 мкМ, разведение плазмы – 1:100, $\lambda_B = 370$ нм, $\lambda_P = 400–650$ нм); катионный – Хинальдиновый красный взаимодействует с α -1-КГП (концентрация зонда 1 мкМ, разведение плазмы – 1:15, $\lambda_B = 496$ нм, $\lambda_P = 540–720$ нм); нейтральный – Нильский красный распределяется между ЧСА и ЛП в нефракционированной плазме крови (концентрация зонда 2 мкМ, разведение плазмы – 1:5, спектр синхронного сканирования, $\lambda_B = 480–700$ нм, $\lambda_P = 495–715$ нм, $\Delta = 15$ нм) [1, 2].

Результаты и обсуждения

В работе были проанализированы параметры связывания флуоресцентных зондов в плазме крови здоровых доноров (контрольная группа) и больных с ОМЛ и ХМЛ. Для анализа полученных данных нами были использованы пиковые значения интенсивностей зондов АНС и ХК как показатель общей связывающей способности транспортных белков. В случае зонда НК, сольватохромные свойства которого делают его удобным для тестирования распределения нейтральных гидрофобных веществ между сывороточными липопротеинами и альбумином в нефракционированной плазме крови, был использован флуоресцентный параметр – отношение пиковой интенсивности липопротеин-связанного зонда НК ($\lambda_{max} = 554$ нм) к альбумин-связанному зонду НК ($\lambda_{max} = 592$ нм) – I_{554}/I_{592} (рис. 1) [1, 2]. На рис. 1 представлены значения флуоресцентных параметров зондов АНС, ХК и НК в плазме крови больных с ОМЛ и ХМЛ. Флуоресцентные параметры зондов АНС и ХК были взяты по отношению к контрольной группе. Как видно из рисунка, наблюдается незначительное понижение связывающей способности альбумина по отношению к анионным лигандам (по данным зонда АНС) для больных с ХМЛ и практически не отличается от контрольной группы для пациентов с ОМЛ. Отношение интенсивности флуоресценции липопротеин-связанного зонда НК к альбумин-связанному зонду НК, характеризующее связывающую способность липопротеинов и альбумина к нейтральным лигандам, показало, что не происходит изменений в связывающей способности липопротеинов и альбумина по отношению к нейтральным метаболитам для больных с ХМЛ по сравнению с контрольной группой. Исключение составляют больные с ОМЛ. Поскольку для этой группы больных концентрация альбумина практически остается в норме (табл. 1), то уменьшение значения I_{554}/I_{592} может быть вызвано как уменьшением концентрации липопротеинов (гиполипидемия), так и большой загруженностью липопротеинов нейтральными гидрофобными лигандами.

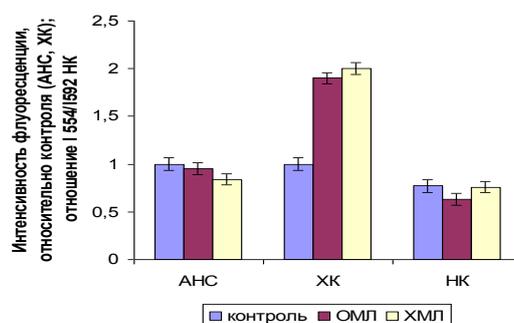


Рис. 1. Влияние различных форм лейкоза на флуоресцентные параметры зондов АНС, ХК и НК в плазме крови

Таблица 1. Значения концентрации альбумина у больных

Исследованная группа	Концентрация альбумина, мг/мл
Контрольная группа (n = 40)	46,8±2,5
ОМЛ (n = 20)	44,7±2,0
ХМЛ (n = 30)	42,9±2,8

Анализ спектров флуоресценции зонда ХК показал, что интенсивность флуоресценции этого зонда в плазме крови больных для ОМЛ и ХМЛ значительно возрастает по сравнению со здоровыми донорами. Это свидетельствует, по-видимому, о повышении концентрации α -1-кислого гликопротеина в связи с наличием воспалительного процесса. Надо отметить, что, гематологические больные характеризуются наличием глубокого иммунодефицита и вероятностью при этом высокого риска инфекционных заболеваний, что может привести к значительному увеличению концентрации α -1-кислого гликопротеина, как белка острой фазы воспаления. Перед трансплантацией ГСК пациентам назначается высокодозная полихимиотерапия. Нами были проанализированы спектры флуоресценции плазмы крови больных с ОМЛ и ХМЛ при проведении им ВХТ и ТСК. Данные приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Значения флуоресцентных параметров зондов и концентрации альбумина для больных с ОМЛ и ХМЛ при проведении им высокодозной химиотерапии

Процедура (ВХТ)	СчСА, г/л	I _{АНС} , о.е.	I ₅₅₄ /I ₅₉₂ НК	I _{ХК} , о.е.
ОМЛ				
До ВХТ	45,3±2,3	89,3±3,1	0,63±0,06	7,3±0,5
2-е сутки	43,9±2,2	101,4±2,9	0,84±0,05	6,4±0,4
После	44,1±2,1	94,0±2,3	0,66±0,07	7,9±0,5
ХМЛ				
До ВХТ	44,1±3,1	88,2±3,1	0,97±0,06	9,2±0,5
2-е сутки	40,5±2,9	86,4±2,7	0,83±0,05	9,3±0,4
4-е сутки	43,2±1,9	102,1±1,8	0,80±0,03	8,2±0,5
После	38,1±2,0	82,5±3,1	0,73±0,04	9,0±0,4

Как видно из табл. 2 высокодозная химиотерапия у больных с ОМЛ и ХМЛ не оказывает существенного влияния на транспорт катионных лигандов (по данным зонда ХК), но приводит к увеличению связывающей способности альбумина к анионным лигандам (по данным зонда АНС). При это концентрация альбумина у больных ОМЛ остается практически неизменной, а в случае ХМЛ – незначительно уменьшается. Надо отметить, что особенно значительное увеличение связывающей способности альбумина к анионным лигандам в плазме крови больных с ОМЛ наблюдается на второй день ВТХ. В основе таких изменений могут лежать две причины:

1) на 2-ые сутки ВХТ принимается большое количество лекарственных препаратов, которые можно рассматривать как гидрофобные лиганды. Как известно из литературы, ассоциация различных лигандов, в том числе и лекарственных препаратов, может вызвать изменения конформации молекулы белка с выходом на поверхность дополнительных активных центров связывания;

2) мобилизация резервных возможностей организма по детоксикации (по выводу из организма лигандов через кожу, мембраны и т.д.).

Следует отметить, что на вторые сутки у больных ОМЛ также происходит увеличение отношения интенсивности флуоресценции липопротеин-связанного зонда НК к альбумин-связанному зонду НК, характеризующее связывающую способность липопротеинов и альбумина к нейтральным лигандам. Поскольку для больных с ОМЛ концентрация альбумина практически остается в норме, то увеличение значения I₅₅₄/I₅₉₂ может быть вызвано как гиперлипидемией, так и уменьшением загруженности липопротеинов. Обратная зависимость наблюдается для больных с ХМЛ. В работе была исследована плазма больных ОМЛ и больных ХМЛ до и после проведения им трансплантации ГСК. Забор крови осуществлялся по следующей схеме: день трансплантации, 6–7 сут после ТГСК – наиболее глубокое снижение показателей общего анализа крови (лейкоцитов, тромбоцитов) и 10–14 сут после трансплантации – восстановление кроветворения. Для больных с ОМЛ (табл. 3) в

посттрансплантационный период наблюдается уменьшение концентрации альбумина, что можно объяснить большой нагрузкой на печень лекарственных препаратов. Это может привести к снижению синтезирующей способности печени (синтез альбумина) и соответственно к снижению связывающей способности альбумина.

Таблица 3. Значения флуоресцентных параметров зондов и концентрации альбумина для больных с ОМЛ и ХМЛ при трансплантации стволовых клеток

Процедура ТГСК	С _{чСА} , г/л	I _{АнС} , о.е.	I ₅₅₄ / I ₅₉₂ НК	I _{ХК} , о.е.
ОМЛ				
До ТГСК	44,1±2,3	94,0±3,1	0,66±0,04	7,9±0,5
6–7-е сутки после ТГСК	39,5±2,2	83,2±2,9	0,74±0,05	9,0±0,4
10–14-е сут. после ТГСК	38,4±2,1	88,8±2,3	0,81±0,06	6,6±0,5
ХМЛ				
До ТГСК	38,0±2,1	80,1±3,1	0,81±0,05	8,2±0,4
6–7-е сут. после ТГСК	38,5±1,9	80,5±2,9	0,99±0,04	7,4±0,5
10–14-е сут. после ТГСК	37,1±1,9	83,3	0,89±0,03	8,5±0,3

Особенно следует обратить внимание на 10–14 сут посттрансплантационного периода. Этот период характеризуется полным восстановлением кроветворения. В этот период достоверно снижается связывающая способность α-1-кислого гликопротеина у пациентов с ОМЛ и значение отношения I₅₅₄ / I₅₉₂ стремится к донорским показателям (для контрольной группы I₅₅₄ / I₅₉₂ = 0,77±0,07).

Заключение

Независимо от формы лейкоза (ОМЛ, ХМЛ), в плазме крови больных наблюдается резкое увеличение связывающей способности α-1-кислого гликопротеина к катионным лигандам, что свидетельствует о сильном воспалительном процессе в организме. Обнаружено, что ВХТ у больных с ОМЛ может привести как к конформационным изменениям молекулы альбумина, так и к увеличению резервных возможностей организма. У пациентов с ОМЛ в посттрансплантационный период после проведения ТГСК наблюдается уменьшение воспалительного процесса (по данным зонда ХК), что является благоприятным прогнозом.

ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL STATE OF MAIN TRANSPORT SYSTEMS OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA AND CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA AFTER TRANSPLANTATION THE HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY FLUORESCENT PROBES METHOD

E.V. KOROLIK, A.A. IVANOV, N.I. INSAROVA, O.M. MOROZOVA,
N.F. MILANOVICH, A.L. USS

Abstract

Using the fluorescent probes method the conformational changes in albumin have been found in case of chemotherapy high doses applied for treatment of patients with acute myeloid leukemia, as well as the inflammatory process has been decreased after the transplantation of hematopoietic stem cells.

Keywords: fluorescent probe, leukemia, high-dose chemotherapy, hematopoietic stem cells, lipoproteins, α-1-acid glycoprotein.

Список литературы

1. Короленко Е.А., Королик Е.В., Королик А.К. и др. // ЖПС. 2007. Т. 74. № 4. С. 507–511.
2. Ivanov A.I., Gavrilov V.B., Furmanchuk D.A. et al. // Clin. Exp. Med. 2002. Vol. 2. P. 147–155.
3. Korolik E.V., Korolenko E.A., Kazakov F.I. et al. // Nonlinear phenomena in complex systems. 2011. Vol. 14, № 3. P. 290–294.