

Особенности инфракрасных спектров сыворотки крови больных множественной миеломой

© Д.А. Чернышев¹, Э.С. Михайлец¹, Л.В. Плотникова¹, А.Д. Гарифуллин^{1,2}, А.Ю. Кувшинов², С.В. Волошин^{2,3}, А.М. Поляничко^{1,4¶}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет,
199034 Санкт-Петербург, Россия

² Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России,
191024 Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова,
194044 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт цитологии РАН,
194064 Санкт-Петербург, Россия

¶ e-mail: a.polyanichko@spbu.ru

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

В окончательной редакции 30.01.2023 г.

Принята к публикации 04.02.2023 г.

Проведен сравнительный анализ инфракрасных (ИК) спектров сыворотки крови здоровых доноров и больных множественной миеломой (ММ). Для ММ характерна гиперпродукция парапротеина, что проявляется в изменении профиля спектра ИК поглощения в среднем ИК диапазоне. Показано, что наиболее значимые отклонения в спектрах наблюдаются для образцов секретирующей ММ вблизи полос Амид I и Амид II'. В результате сравнительного анализа ИК спектров сыворотки крови в области 1700–1350 см⁻¹ установлены 9 параметров, средние значения которых у образцов, полученных от пациентов с секретирующей формой ММ, существенно отличаются от аналогичных показателей для сыворотки здоровых доноров.

Ключевые слова: ИК спектроскопия, множественная миелома, сыворотка крови, вторичная структура белков.

DOI: 10.21883/OS.2023.06.55914.105-23

Введение

На сегодняшний день 10% всех злокачественных гематологических заболеваний и около 1% всех раковых заболеваний приходится на множественную миелому (ММ) [1]. Согласно данным SEER(US Surveillance Epidemiology and End Results Programme), люди с тёмным цветом кожи подвержены развитию ММ приблизительно в два раза чаще, чем люди со светлой кожей. Данное заболевание преимущественно проявляется у пожилых людей [2,3]. Количество новых диагностированных случаев с каждым годом становится больше. Так, за 2016 г. в США было диагностировано чуть более 30 000 новых случаев миеломы, что на 10 000 больше, чем в 2009 г. [4,5]. А в 2020 г. было диагностировано более 32 000 новых случаев ММ [6]. В настоящее время не существует надежных способов медикаментозного лечения ММ, и существующая терапия направлена, в первую очередь, на ослабление симптомов и замедление развития болезни [7].

Множественная миелома — опухолевое заболевание плазматических клеток, возникающее в костном мозге и распространяющееся по организму посредством кровеносной системы. Множественная миелома относится к группе парапротеинемических лейкозов, характеризующихся способностью синтезировать иммуноглобулины

или их фрагменты — парапротеины [8–10]. Выделяют несколько типов данной патологии: ММ с секрецией М-протеина в больших количествах, характеризующуюся типом М-протеина, а также более редкую несекретирующую ММ, когда гиперпродукции парапротеина не наблюдается [11]. В качестве М-протеина могут выступать иммуноглобулины G-, A-, D-, M-типов или их фрагменты — κ - или λ -легкие цепи, именуемые белками Бена-Джонсона [3].

Своевременная диагностика ММ является одним из важных факторов, определяющих как подходы к терапии, так и возможный ответ на лечение. Однако разнообразие клинических проявлений [3,9,12], которыми может сопровождаться развитие ММ, осложняет постановку диагноза на ранних стадиях заболевания [3,13,14]. В связи с этим возникает необходимость в поиске новых простых и доступных методик первичного скрининга широкого круга пациентов с целью выявления признаков развития ММ. Одним из перспективных инструментов для выявления различных патологий может выступать инфракрасная (ИК) спектроскопия [15–20]. В настоящей работе проведен сравнительный анализ ИК спектров сыворотки крови больных множественной миеломой и здоровых доноров.

Материалы и методы

Образцы сыворотки

В работе проведен анализ сыворотки крови больных ММ, находящихся под наблюдением гематологической клиники Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, Россия). Образцы были получены сотрудниками НИИ гематологии и трансфузиологии в соответствии со стандартным клиническим протоколом, описанным ранее [18]. Для получения образцов сыворотки крови использовали пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия) с активатором свертывания. Собранные образцы крови оставляли в пробирках в течение 20–30 min при комнатной температуре (18–24°C), после чего центрифугировали в течение 15 min при скорости 3000 rot/min на центрифуге Heraeus Labofuge 200 (Thermo Scientific, США). Основной объем образца замораживали и хранили при температуре –30°C до проведения спектроскопических исследований.

В настоящем исследовании были проанализированы образцы от 25 здоровых доноров, 36 больных ММ. У 8 пациентов была диагностирована несекретирующая форма ММ. Среди больных было 17 мужчин и 19 женщин. Возраст этой группы пациентов находился в диапазоне от 44 до 82 лет, средний возраст составил 61 год.

ИК спектроскопия

Спектры поглощения в среднем ИК диапазоне (4000–800 cm^{-1}) регистрировали на ИК фурье-спектрометре Tensor 27 (Bruker), оснащенный низкочастотным детектором МСТ (HgCdTe), охлаждаемом жидким азотом. Оптические пути продували газообразным азотом с расходом не менее 10 l/min. Все спектры регистрировали с разрешением 2 cm^{-1} и усредняли по 128 накоплениям. Перед измерением образцы сыворотки подвергли трехкратной лиофильной сушке с промежуточным изотопным замещением растворителя на D_2O в соответствии с ранее описанной методикой [18,21]. Образцы исследовали в растворах D_2O с использованием разборных жидкостных кювет на основе кристаллов BaF_2 с длиной оптического пути 50 μm . Первичную обработку и анализ спектров проводили с помощью программного обеспечения, поставляемого с прибором, в соответствии с описанной ранее методикой [22,23].

Результаты и обсуждение

Поглощение в среднем ИК диапазоне обусловлено колебаниями атомов в молекуле, сопровождающимися изменением дипольного момента связи или химической группы. Поглощение белковых молекул в этой области спектра связано прежде всего с колебаниями в пептидной связи. Эти колебания проявляются в спектрах

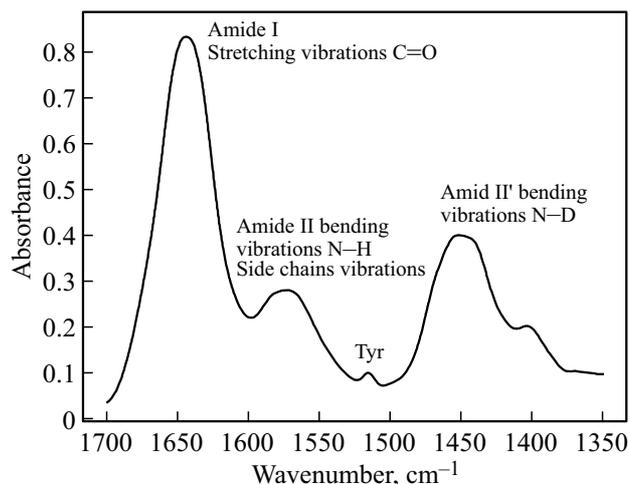


Рис. 1. Спектр поглощения сыворотки крови в диапазоне 1700–1350 cm^{-1} . Отнесение полос проведено на основании работ [24,25,27].

в виде нескольких широких полос, известных как полосы „Амид“. Колебания связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ весьма чувствительны к изменению конформации полипептида, что позволяет использовать спектры поглощения белков для анализа их вторичной структуры. Наиболее информативным с этой точки зрения является анализ полосы Амид I, которая обусловлена преимущественно колебаниями карбонильной группы и наблюдается в спектрах в окрестности 1650 cm^{-1} .

На практике регистрация ИК спектров поглощения водных растворов белков осложняется сильным поглощением воды (H_2O) в этой области спектра. По этой причине измерения традиционно проводятся после изотопного замещения растворителя на тяжелую воду (D_2O), у которой в области колебаний Амид I имеется окно прозрачности.

Для проведения сравнительного анализа нами были получены спектры образцов сыворотки крови здоровых доноров и больных ММ. Типичный спектр поглощения сыворотки крови представлен на рис. 1. В спектре отчетливо наблюдаются несколько полос поглощения, относящихся как к колебаниям полипептидного остова, так и к колебаниям групп в составе боковых цепей аминокислотных остатков [24–27]. В диапазоне волновых чисел 1700–1600 cm^{-1} располагается доминирующая в спектре полоса Амид I, обусловленная колебаниями карбонильных групп в составе полипептидного остова. Область 1600–1500 cm^{-1} содержит суперпозицию колебаний боковых цепей и остаточный вклад полосы Амид II, соответствующей деформационным колебаниям групп $\text{N}-\text{H}$ пептидной связи, расположенных во внутренних областях белковых молекул, для которых затруднены обменные процессы $\text{H} \leftrightarrow \text{D}$ с растворителем. Отдельно в этой области выделяется полоса с максимумом при 1517 cm^{-1} , которая может быть отнесена к колебаниям боковой цепи тирозина [24,26]. При

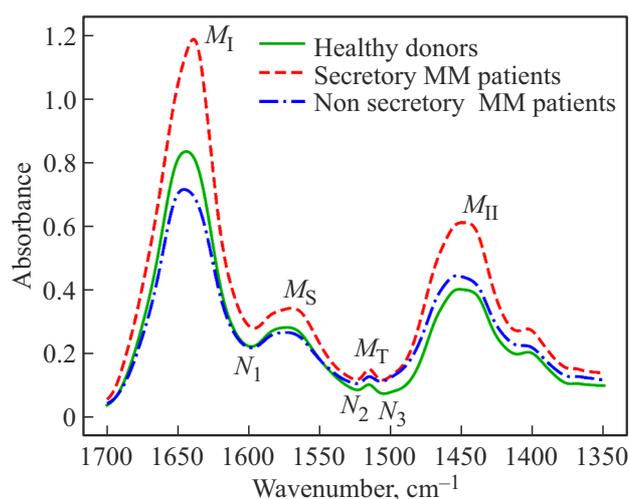


Рис. 2. Пример спектров ИК поглощения сыворотки крови здорового донора (сплошная линия), пациента с секреторирующей (штриховая линия) и несекретирующей ММ (штрихпунктир). На рисунке обозначены выбранные для сравнения точки в спектрах.

изотопном замещении растворителя за счет обменных процессов в растворе атомы водорода в группах N–H пептидной связи также в основном замещаются на дейтерий, образуя группу N–D. Соответствующая полоса Амид II в результате смещается примерно на 100 cm^{-1} в область меньших волновых чисел до $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ и обозначается Амид II' [25].

Как уже отмечалось выше, форма полосы Амид I весьма чувствительна ко вторичной структуре белков [20]. В связи с тем, что развитие ММ сопровождается существенным изменением белкового состава сыворотки крови [8–10], анализ полосы Амид I позволяет выявлять статистически значимые различия в средних значениях основных параметров вторичной структуры белков в составе сыворотки пациентов с диагнозом ММ и здоровых доноров [18,28]. Однако данный подход не вполне удобен для проведения широкого скрининга, так как требует достаточно трудоемкой обработки каждого спектра в отдельности и ограничен пригоден для автоматического анализа. Вместе с тем для классификации образцов больных ММ и здоровых доноров численные значения параметров вторичной структуры белков не требуются. Вместо этого, пользуясь высокой информационной насыщенностью ИК спектров, можно попытаться отождествить в них различные особенности, характерные для каждой группы образцов. В качестве таких особенностей могут выступать наличие или отсутствие отдельных полос, положение их максимумов/минимумов, относительные интенсивности полос и пр.

На рис. 2 представлены характерные спектры сыворотки крови здорового донора, а также больных с секреторирующей и несекретирующей формами ММ. В рамках настоящей работы мы ограничились анализом спектров

в диапазоне волновых чисел $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$, так как ранее именно этот диапазон был выделен как наиболее информативный при анализе различий в белковом составе крови и сыворотки [18,28,29]. Следует отметить, что хотя наблюдаемые в спектрах различия в абсолютных величинах поглощения и отражают объективные изменения в белковом составе сыворотки крови при развитии ММ отдельно взятого пациента, однако не могут использоваться в качестве самостоятельного надежного критерия классификации образцов, полученных от разных людей. В настоящей работе мы анализировали полученные ИК спектры прежде всего на наличие простых характеристических особенностей, таких как положение наиболее явных максимумов/минимумов и соответствующих им значений поглощения (рис. 2), которые позволили бы классифицировать образцы больных ММ и здоровых доноров.

Для наглядности все полученные в работе соотношения между выбранными спектральными параметрами нормированы на аналогичные соотношения для здоровых доноров. Полученные для каждого спектра соотношения параметров усреднялись с аналогичными соотношениями для всех образцов каждой группы (здоровые доноры, образцы секреторирующей ММ и образцы несекретирующей ММ). Средние значения для всех параметров, демонстрирующих значимые отличия между образцами здоровых доноров и больных ММ, сведены в таблице. В качестве погрешности приведено среднеквадратичное отклонение для соответствующей группы образцов.

Для образцов секреторирующей ММ наиболее значимые отклонения от здоровых доноров наблюдаются для соотношений параметров, располагающихся вблизи полос Амид I и Амид II'. При этом соотношения различных параметров демонстрируют разнонаправленные изменения. В частности, отношения поглощения полос Амид I и Амид II' к поглощению полосы боковых цепей M_S возросли в образцах ММ и составили соответственно $M_I/M_S = 1.16 \pm 0.02$ и $M_{II'}/M_S = 1.15 \pm 0.03$. Напротив, отношение поглощения полосы боковых цепей M_S к полосе поглощения тирозина M_T для образцов секреторирующей ММ оказалось ниже, чем для доноров, $M_S/M_T = 0.87 \pm 0.03$. В целом, полученные результаты (таблица) позволяют описать различия в спектрах образцов сыворотки крови больных ММ и здоровых доноров по девяти основным параметрам. Полученные результаты могут быть проиллюстрированы при помощи радиальной диаграммы (рис. 3, а), которая дает наглядное представление о величине и направлении изменения основных параметров, по которым наблюдаются различия в спектрах секреторирующей ММ и здоровых доноров.

Для образцов несекретирующей ММ статистически достоверных отличий в выбранных параметрах нами обнаружено не было (рис. 3, б). Данный результат обусловлен двумя обстоятельствами. Во-первых, сходство спектров образцов несекретирующей ММ и здоровых доноров в области колебаний Амид I–Амид II отражает

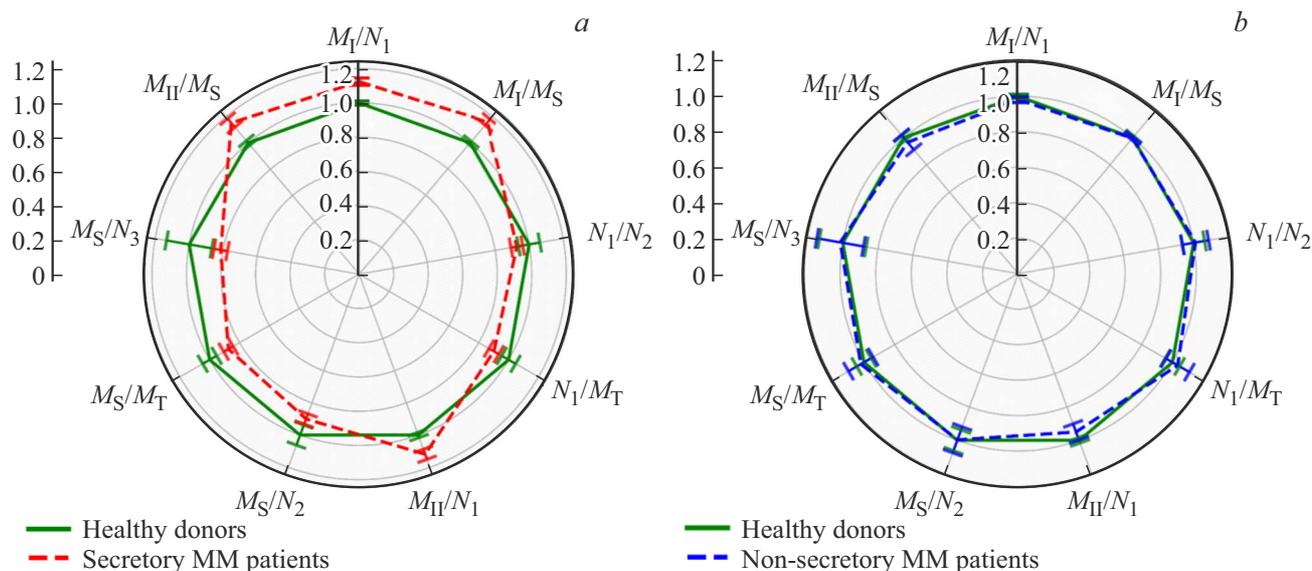


Рис. 3. Радиальная диаграмма, отображающая соотношения между выбранными спектральными параметрами (таблица) для сыворотки крови здоровых доноров (сплошная линия) и пациентов (штриховая линия) с диагнозом: (а) секретирующая форма ММ, (b) несекретирующая форма ММ.

Нормированные* значения соотношений поглощения в спектральных максимумах и минимумах для образцов здоровых доноров и больных ММ

Соотношение	Здоровые доноры	Секретирующая ММ	Несекретирующая ММ
M_1/N_1	1.00 ± 0.02	1.12 ± 0.02	0.98 ± 0.02
M_1/M_S	1.00 ± 0.01	1.16 ± 0.02	1.00 ± 0.01
N_1/N_2	1.00 ± 0.06	0.93 ± 0.03	1.01 ± 0.08
N_1/M_T	1.00 ± 0.05	0.9 ± 0.03	1.03 ± 0.09
N_1/M_{II}	1.00 ± 0.02	1.12 ± 0.03	0.95 ± 0.05
M_S/N_2	1.00 ± 0.06	0.90 ± 0.03	1.00 ± 0.08
M_S/M_T	1.00 ± 0.05	0.87 ± 0.03	1.02 ± 0.08
M_S/N_3	1.0 ± 0.1	0.81 ± 0.04	1.0 ± 0.1
M_S/M_{II}	1.00 ± 0.02	1.15 ± 0.03	0.97 ± 0.06

* Приведенные значения нормированы на значения соответствующих соотношений для здоровых доноров.

сходство белкового состава данных образцов. Во-вторых, в силу меньшей распространенности несекретирующей формы ММ данная группа содержит существенно меньшее количество образцов, что привело к заметно большей погрешности определения анализируемых спектральных параметров. Тем не менее нельзя исключать возможность того, что при наборе достаточной статистики возможно будет выявить достоверные отличия и для данной группы образцов.

Таким образом, в результате сравнительного анализа ИК спектров сыворотки крови в области $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ были установлены 9 параметров, средние значения которых у образцов, полученных от пациентов с секретирующей формой ММ, существенно

отличаются от аналогичных показателей для сыворотки здоровых доноров. Мы полагаем, что полученные результаты указывают на перспективность метода ИК спектроскопии для разработки методически простой, быстрой и недорогой методики скрининга с целью выявления признаков развития ММ.

Благодарности

Работа была выполнена с использованием оборудования ресурсных центров Научного парка СПбГУ („Оптические и лазерные методы исследования вещества“, „Центр диагностики функциональных материалов для

медицины, фармакологии и наноэлектроники“, „Криогенный отдел“).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Список литературы

- [1] S.V. Rajkumar. *Am. J. Hematol.*, **95**, 548–567 (2020). DOI: 10.1002/ajh.25791
- [2] B. Sirohi, R. Powles. *Eur. J. Canc.*, **4** (11), 1671–1683 (2006). DOI: 10.1016/j.ejca.2006.01.065
- [3] K.C. Nau, W.D. Lewis. *Am. Farm. Physician.*, **78** (7), 853–859 (2008).
- [4] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. *Cancer J. Clinic.*, **66** (1), 7–30 (2016). DOI: 10.3322/caac.21332
- [5] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, M.J. Thun. *Cancer J. Clinic.*, **59** (4), 225–249 (2009). DOI: 10.3322/caac.20006
- [6] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal. *Cancer J. Clinic.*, **70** (1), 7–30 (2020). DOI: 10.3322/caac.21590
- [7] S.V. Rajkumar, S. Kumar. *Mayo Clinic Proceedings.*, **91** (1), 101–119 (2016). DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.11.007
- [8] R.A. Kyle, S.V. Rajkumar. *New Engl. J. Med.*, **351** (18), 1860–1873 (2004). DOI: 10.1056/NEJMra041875.
- [9] D.D. Alexander, P.J. Mink, H.O. Adami, P. Cole, J.S. Mandel, M.M. Oken, D. Trichopoulos. *Int. J. Canc.*, **120** (12), 40–61 (2007). DOI: 10.1002/ijc.22718
- [10] A. Palumbo, K. Anderson. *New Engl. J. Med.*, **364** (11), 1046–1060 (2011). DOI: 10.1056/NEJMra1011442
- [11] M.M. Dupuis, S.A. Tuchman. *Onco Targets Ther.*, **9**, 7583–7590 (2016). DOI: 10.2147/OTTS.122241
- [12] S.V. Rajkumar, M.A. Dimopoulos, A. Palumbo et al. *Lancet Oncol.*, **15** (12), 538–548 (2014). DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70442-5
- [13] A. Smith, F. Wisloff, D. Samson. *Brit. J. Haematol.*, **132** (4), 410–451 (2006). DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05867.x
- [14] M. Dimopoulos, R. Kyle, J.P. Fermand, S.V. Rajkumar, J. San Miguel, A. Chanan-Khan. *Blood*, **117** (18), 4701–4705 (2011). DOI: 10.1182/blood-2010-10-299529
- [15] L. Benezzeddine-Boussaidi, G. Cazorla, A.M. Melin. *Clinic. Chem. Lab. Med.*, **47** (1), 83–90 (2009). DOI: 10.1515/CCLM.2009.007
- [16] V.E. Sitnikova, M.A. Kotkova, T.N. Nosenko, T.N. Kotkova, D.M. Martynova, M.V. Uspenskaya. *Talanta*, **214**, 120857 (2020). DOI: 10.1016/j.talanta.2020.120857
- [17] J. Titus, H. Ghimire, E. Viennois, D. Merlin, A.G. Unil Perera. *J. Biophoton.*, **11** (3), (2017). DOI: 10.1002/jbio.201700057
- [18] E.A. Telnaya, L.V. Plotnikova, A.D. Garifullin, A.Yu. Kuvshinov, S.V. Voloshin, A.M. Polyanichko. *Biophysics*, **65** (6), 981–986 (2020). DOI: 10.1134/S0006350920060214
- [19] S. Hu, J.A. Loo, D.T. Wong. *Proteomics.*, **6** (23), 6326–6353 (2006). DOI: 10.1002/pmic.200600284.
- [20] L.V. Plotnikova, M.O. Kobeleva, E.V. Borisov, A.D. Garifullin, A.V. Povolotskaya, S.V. Voloshin, A.M. Polyanichko. *Cell and Tissue Biology*, **13** (2), 130–135 (2019). DOI: 10.1134/S1990519X19020093
- [21] A.M. Polyanichko, V.V. Andrushchenko, E.V. Chikhirzhina, V.I. Vorob'ev, H. Wieser. *Nucleic Acids Res.*, **32** (3), 989–996 (2004). DOI:10.1093/nar/gkh242
- [22] J.R. Powell, F.M. Wasacz, R.J. Jakobsen. *Appl. Spectrosc.*, **40** (3), 339–344 (1986).
- [23] A.M. Polyanichko, N.M. Romanov, T.Y. Starkova, E.I. Kostyleva, E.V. Chikhirzhina. *Cell and Tissue Biology*, **8** (4), 352–358 (2014). DOI: 10.1134/S1990519X14040087
- [24] M. Baldassarre, A. Sciré, F. Tanfani. *Biomed. Spectrosc. Imag.*, **1** (3), 247–259 (2012). DOI: 10.3233/bsi-2012-0021
- [25] Y.N. Chirgadze, O.V. Fedorov, N.P. Trushina. *Biopolymers*, **14** (4), 679–694 (1975). DOI: 10.1002/bip.1975.360140402
- [26] K. Rahmelow, W. Hübner, T. Ackermann. *Analyt. Biochem.*, **257** (1), 1–11 (1998). DOI: 10.1006/abio.1997.2502
- [27] A. Barth. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767** (9), 1073–1101 (2007). DOI: 10.1016/j.bbabo.2007.06.004
- [28] L.V. Plotnikova, M.O. Kobeleva, E.V. Borisov, A.D. Garifullin, A.V. Povolotskaya, S.V. Voloshin, A.M. Polyanichko. *Cell and Tissue Biology*, **13** (2), P. 130–135 (2019). DOI: 10.1134/S1990519X19020093
- [29] J. Depciuch, M. Sowa-Kucma, G. Nowak, M. Papp, P. Gruca, P. Misztak, M. Parlinska-Wojtan. *Spectrochim. Acta A*, **176**, 30–37 (2017). DOI: 10.1016/j.saa.2016.12.007