

Н.І. Стекленьова
Т.П. Ніколаєнко
А.І. Шевцова
А.З. Бразалук
К.Ю. Литвин

Дніпропетровська державна
медична академія

Дніпропетровська
міська багатопрофільна
клінічна лікарня № 4,
Дніпропетровськ, Україна

Ключові слова:

α-кислий глікопротеїд, глікозильованість, конканавалін А, фітогемаглютинін L, запальні процеси, злоякісні новоутворення панкреатодуоденальної зони, лейкомії, лімфоми, множинна мієлома.

МІКРОГЕТЕРОГЕННІСТЬ α-КИСЛОГО ГЛІКОПРОТЕЇДУ ПРИ ОНКОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ ТА ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСАХ

Резюме. Проведено дослідження вмісту та глікозильованості α-кислого глікопротеїду (АГП) у сироватці крові 71 пацієнта з різними онкозахворюваннями та запальними процесами. Виявлено достовірне підвищення (у 2–4 рази) рівня АГП у сироватці крові у хворих з гострим запаленням та онкопатологією та зміни структури вуглеводного компонента АГП, що корелюють з характером захворювання. Показано достовірне підвищення вмісту поліантенних структур у складі АГП у пацієнтів з вірусними гепатитами та пухлинами панкреатодуоденальної зони. Відсутність глікоформи АГП, що сильно зв'язується з конканаваліном А, є специфічним показником механічних жовтяниць, зумовлених злоякісними новоутвореннями. РНА-L-зв'язуюча здатність АГП при позагоспітальних пневмоніях достовірно нижче порівняно з нормою і з синдромом системної запальної відповіді.

ВСТУП

Альфа (α)-1-кислий глікопротеїд (АГП), або орозомукоїд — білок сироватки крові, що відноситься до групи білків гострої фази запалення. Молекулярна маса АГП — 41–43 кДа, він містить близько 45% вуглеводів і має дуже високий негативний заряд. Поліпептидний ланцюг АГП складається із 183 амінокислот, підтримується двома дисульфідними зв'язками між залишками цистеїну і включає п'ять залишків аспарагіну, що зв'язані з N-гліканами комплексного типу [1]. У крові орозомукоїд присутній у вигляді декількох молекулярних форм, ідентичних за первинною послідовністю поліпептидної частини, але різних за складом вуглеводних ланцюгів і відповідно за біологічною активністю [2].

АГП синтезується в основному у печінці та частково в інших органах, у тому числі в осередках пухлинного росту [3]. Нещодавно показано, що АГП може синтезуватись мієлоцитами та секретуватись вторинними гранулами поліморфноядерних нейтрофілів [4]. Відомо, що у нормі синтезується АГП, який містить бі-, три- та тетраантенні N-глікани, а при запальних процесах превалює АГП з біантенними гліканами [5]. Онкологічні захворювання супроводжуються підвищенням вмісту поліантенних гліканів внаслідок підвищення експресії 1,4- та 1,6-розгалужених три- та тетраантенних структур [6]. Орозомукоїд, що секретується активованими нейтрофілами, має більшу молекулярну масу за рахунок підвищення фукозильованості його гліканів та наявності полілактозамінних залишків [4]. Таким чином, кількість і співвідношення глікоформ АГП, що циркулюють у крові, залежать від джерел його син-

тезу та можуть повною мірою відображати патологічний процес у організмі людини.

Мета роботи — порівняння вмісту АГП та його глікозильованості при різних онкологічних захворюваннях та запальних процесах.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 71 хворого віком від 20 до 68 років, з них 45 — з онкологічною патологією, 26 — з запальними процесами різного генезу. До першої групи увійшли 8 хворих на гострі лейкомії (ГЛ) та 15 — на хронічні лейкомії (ХЛ): 9 — на хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) та 6 — на хронічний мієлолейкоз (ХМЛ). У 4 пацієнтів діагностована множинна мієлома; у 2 — В-клітинна лімфома; у 16 обстежених діагностовані солідні злоякісні пухлини панкреатодуоденальної зони (ПДЗ). Другу групу становили 17 пацієнтів, у яких діагностовано гострий вірусний гепатит (ГВГ); 6 — з синдромом системної запальної відповіді (SIRS) та 3 — гострою позагоспітальною пневмонією. У всіх пацієнтів виключено супутню патологію. У контрольну групу увійшли 26 практично здорових осіб відповідного віку (жінки і чоловіки), що не мали гострозапальних явищ на початок дослідження.

Вміст АГП визначали методом ракетного електрофорезу в 1% агарозному гелі, що містив моноспецифічну поліклональну антисироватку до цього глікопротеїду (рис. 1). Антисироватку до АГП отримували імунізацією кролів внутрішньошкірно препаратом білка фірми «Sigma» (G9885-5MG) за розробленою схемою. Специфічність одержаних антитіл доводили методами імуноелектрофорезу та імуноблотінгу. Для оцінки співвідношення глікоформ АГП

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

проводили перехресний афінний імуоелектрофорез (ПАІЕ) у 1% агарозному гелі у присутності у першому напрямку лектину *Canavalia ensiformis* (ConA) або *Phaseolus vulgaris* (РНА-L) («Лектинотест», Україна), у другому напрямку — антитіл до АГП. Для всіх варіантів електрофорезу використовували трис-вероналовий буфер (рН 8,6). Взаємодія АГП з ConA зумовлює появу трьох піків, що характеризують ступінь спорідненості до лектину (рис. 2). При цьому пік 1 (АГП-1) представлений молекулами АГП, що не зв'язуються з лектином, пік 3 (АГП-3) — молекулами із сильною спорідненістю до лектину, а пік 2 (АГП-2) — проміжний варіант із слабкою спорідненістю. Прийнято, що фракція АГП-3 містить 2 та більше біантенних N-гліканів, АГП-2 — 1 сайт з біантенним гліканом та інші 4 — з трьох- та тетраантенними; АГП-1 містить лише поліантенні структури [7]. РНА-L має спорідненість до розгалужених N-гліканів і, навпаки, не зв'язує біантенні структури [8]. При взаємодії АГП з РНА-L утворюється два піка: АГП-1 — фракція, що не зв'язується і АГП-2 — фракція, що зв'язується з лектином (див. рис. 2).

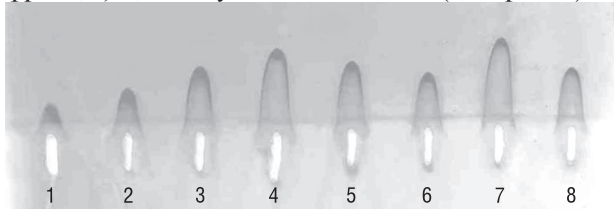


Рис. 1. Ракетний імуоелектрофорез у гелі, що містить антисироватку до АГП (10 мкл/см²): лунки 1–4 — контрольні розчини, що містять відповідно 0,25, 0,32, 0,43 та 0,63 мг АГП; лунки 5–8 — розведена у 30–40 разів сироватка хворих

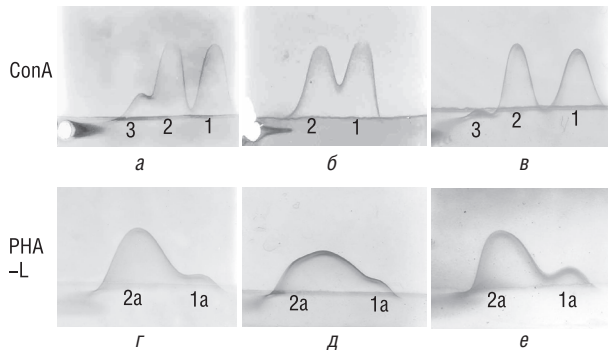


Рис. 2. ПАІЕ АГП з ConA (а, б, в) та РНА-L (г, д, е): а, г — сироватка крові осіб контрольної групи; б, д — пацієнтів 1-ї групи; в, е — 2-ї групи.

У лунку вносили 10 мкл сироватки. Електрофорез у першому напрямку здійснювали у присутності ConA (1 мг/мл) або РНА-L (2 мг/мл), у другому напрямку — у присутності антисироватки до АГП (6 мкл/см²).

1, 2, 3 — фракції АГП-1, АГП-2, АГП-3 за взаємодією з ConA.

1а, 2а — фракції АГП-1, АГП-2 за взаємодією з РНА-L

Кількісне визначення білка проводили за виміром площі преципітаційного піка, статистичну обробку — за допомогою ліцензійної прикладної комп'ютерної програми «Statgraf» на ПК Intel Pentium III. Вірогідність відмінностей визначали за

допомогою критерію Стьюдента та для малих виборок — U-критерію Уїлкоксона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст АГП достовірно підвищується ($p < 0,001$) у всіх групах хворих порівняно із контрольною групою (рис. 3). Це можна оцінювати як адекватну реакцію організму на патологічні процеси, що направлена на відновлення гомеостазу. Найбільший рівень АГП відзначено у пацієнтів з SIRS, що може бути зумовлено проявами поліорганної недостатності. У хворих на пневмонію та ГВГ рівень АГП становив $1,66 \pm 0,22$ та $1,49 \pm 0,17$ мг/мл відповідно, що у 2 рази вище, ніж у контрольній групі. При злоякісних новоутвореннях лімфоїдної тканини рівень АГП достовірно вище, ніж при солідних пухлинах ПДЗ. Враховуючи сучасні дані про секрецію АГП активованими нейтрофілами, вважається, що за наявності перших вони є додатковим джерелом АГП.

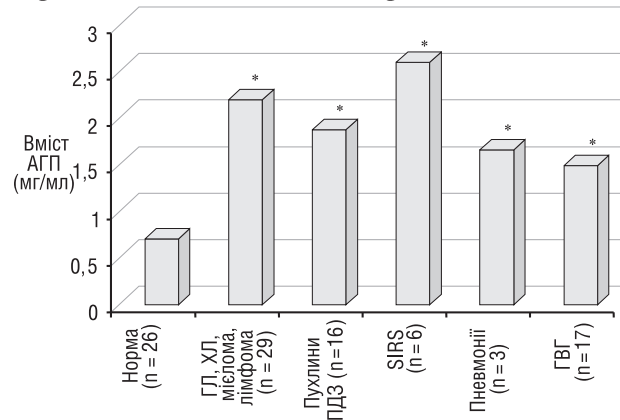


Рис. 3. Вміст АГП у сироватці крові пацієнтів з онкозахворюваннями та із гострим запаленням

*Достовірна різниця порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,001$).

При порівнянні вмісту АГП у хворих з різними формами лейкемії, лімфою та множинною мієломою (рис. 4) достовірної різниці між вмістом АГП при ХЛ та ГЛ не виявлено. При ХЛЛ, ХМЛ, лімфомі середній вміст АГП становив відповідно $2,40 \pm 0,21$ та $2,30 \pm 0,21$ мг/мл, тоді як при множинній мієломі — лише $1,37 \pm 0,16$ мг/мл ($p < 0,05$), що може бути зумовлено наявністю у випадках останньої генералізації пухлинного процесу. При загостренні лейкемічного процесу з приєднанням аутоімунного компонента у вигляді гемолізу та тромбоцитопенії вміст орозомукоїду значно вище порівняно із лейкеміями без аутоімунних ускладнень.

Розподілення глікоформ АГП за спорідненістю до лектинів ConA та РНА-L наведено у таблиці. За даними у нормі співвідношення АГП-1 : АГП-2 : АГП-3 становить 42,5 : 49,3 : 8,2. Зміна ConA-зв'язуючої здатності АГП більш виражена при ГВГ та пухлинах ПДЗ. Слід відзначити, що і при ГВГ, і при пухлинах ПДЗ виявляють різке зниження вмісту фракції АГП-3 практично до повного її зникнення при пухлинних процесах. Лише у 2 пацієнтів з досліджених 16 з пухлинами ПДЗ виявлена ця фракція, у інших

14 — відсутня (див. рис. 2б). Виходячи із специфічності *СопА*, можна зробити висновок про значне зменшення кількості двохантених гліканів та пропорційне йому підвищення вмісту три- та тетраантених структур у складі орозомукоїду при пухлинах ПДЗ. Утворення розгалужених N-гліканів залежить від активності GlcNAc-трансферази V (GnT-V) та N-ацетилглюкозамінілтрансферази III (GnT-III), що ініціюють у транс-Гольджи утворення GlcNAc β -1,6Man- та GlcNAc β -1,4Man-зв'язків і генерують, таким чином, структурне розходження зрілих N-гліканів [9]. Можна припустити, що підвищення вмісту поліантених гліканів у складі орозомукоїду при пухлинах ПДЗ може бути наслідком підвищеної активності цих ферментів.

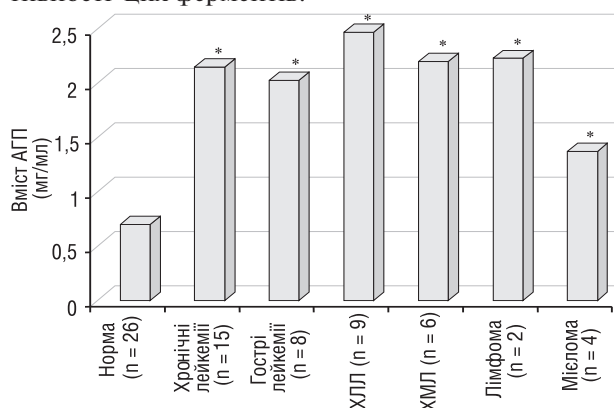


Рис. 4. Вміст АГП (г/л) у сироватці крові пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями

*Достовірна різниця порівняно з показниками контрольної групи ($p < 0,001$).

Тенденцію до зменшення фракції АГП-3 відзначали і у інших хворих 1-ї та 2-ї групи. Оскільки при захворюваннях кровотворної тканини та запальних станах не відзначено статистично достовірної різниці порівняно з нормою, використовували індекс зв'язування, що враховує не лише мікрогетерогенність орозомукоїду, але і його концентрацію. Цей індекс обчислювали як відношення вмісту АГП у піках 2 та 3 (%) до його концентрації у сироватці крові. За наведеними даними індекс зв'язування у пацієнтів з лейкомією у 3–4 рази (достовірно) нижче порівняно зі нормою (див. таблицю). Таку від-

мінність відзначають і у пацієнтів з іншими дослідженими патологічними процесами. Серед обстежених найвищий індекс зв'язування (0,42) відзначено при мієломах. Таким чином, зміна співвідношення глікоформ АГП є більш чутливим та специфічним показником розвитку патологічного процесу, ніж визначення його концентрації у крові, а індекс зв'язування є більш інформативним, ніж співвідношення глікоформ АГП, особливо при аналізі даних у пацієнтів з лейкоміями.

Зміна глікозильованості АГП за умов запальних процесів та онкозахворювань підтверджена при дослідженні взаємодії АГП з лектином РНА-L. За нормою, превалюючою фракцією орозомукоїду є АГП-2, на його долю приходить 86,56% загального АГП (див. таблицю). Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників, що більша частина АГП печінки містить N-глікани з трьома та більше антенами [1]. Результати порівняння спорідненості АГП за умов патологічних станів показали, що при ПДЗ, ВГВ та SIRS має місце достовірне підвищення АГП-2, а за умов пневмонії та ХМЛ — зниження цієї фракції. Враховуючи специфічність РНА-L, можна стверджувати, що у хворих на ПДЗ, ВГВ або SIRS збільшується кількість розгалужених N-гліканів у структурі АГП, а на пневмонію та лейкомію — навпаки знижується.

Виявлені також значні відмінності у загальному характері глікозильованості при порівнянні груп пацієнтів з пухлинами ПДЗ та лейкоміями. Так, у хворих з пухлинами ПДЗ достовірно підвищується вміст розгалужених структур орозомукоїду, тоді як у пацієнтів з лейкоміями такі зміни не відзначають. Ймовірно, що у першому випадку переважаюча частка АГП, циркулюючого у крові, представлена пулом, синтезованим у гепатоцитах, тоді як при захворюваннях кровотворної тканини присутній також АГП, синтезований лейкоцитами [4]. Слід відзначити, що у багатьох випадках встановлюють не чітке відокремлення фракції, що не зв'язується РНА-L (див. рис. 2д). Це може вказувати на ще більш суттєві зміни у глікозуванні орозомукоїду, які пов'язані зі зміною фукозильованості або сіалюваності цього глікопротеїду [10]. Вважається, що подальші до-

Таблиця

Вміст АГП та співвідношення лектинзв'язуючих фракцій АГП у сироватці крові обстежених пацієнтів (%)

Групи	Вміст АГП, г/л	Індекс зв'язування	Співвідношення <i>СопА</i> -зв'язуючих фракцій АГП (%)			Співвідношення РНА-L-зв'язуючих фракцій АГП (%)	
			АГП-1	АГП-2	АГП-3	АГП-1	АГП-2
Контрольна	0,70 ± 0,016	0,82	42,54 ± 0,976	49,32 ± 0,769	8,15 ± 0,377	13,44 ± 0,77	86,56 ± 0,77
Лейкомії, всього	2,20 ± 0,16***	0,27***	41,63 ± 1,56	50,81 ± 1,52	7,83 ± 0,78	16,12 ± 1,28	83,88 ± 1,28
ХЛ	2,36 ± 0,181***	0,24***	43,83 ± 2,127	48,39 ± 1,092	7,78 ± 1,296	16,26 ± 1,325	83,74 ± 1,32
ХЛЛ	2,47 ± 0,23***	0,23***	42,63 ± 2,52	49,36 ± 1,37	8,01 ± 1,59	15,28 ± 1,03	84,87 ± 1,03
ХМЛ	2,20 ± 0,32***	0,25***	45,63 ± 3,92	46,93 ± 1,78	7,44 ± 2,38	18,29 ± 3,13*	81,71 ± 3,13*
ГЛ	2,03 ± 0,36***	0,28***	43,34 ± 2,34	48,21 ± 1,88	8,46 ± 1,27	14,75 ± 3,97	85,25 ± 3,97
Лімфоми	2,23 ± 0,07***	0,25***	43,95 ± 3,25	52,45 ± 2,25	3,60 ± 1,00	14,62 ± 0,66	85,39 ± 0,66
Мієломи	1,37 ± 0,16***	0,42**	41,82 ± 3,25	51,58 ± 3,83	6,61 ± 0,97	17,83 ± 1,58*	82,17 ± 1,58*
SIRS	2,60 ± 0,18***	0,22***	44,09 ± 1,33	46,44 ± 0,98	9,48 ± 1,62	7,56 ± 2,40***	92,44 ± 2,41***
Пневмонії	1,66 ± 0,22***	0,33**	45,79 ± 1,71	48,13 ± 0,83	6,10 ± 0,93	24,89 ± 1,02***	75,11 ± 1,02***
Пухлини ПДЗ	1,88 ± 0,25***	0,20***	62,27 ± 2,91***	37,21 ± 2,84***	0,53 ± 0,27***	8,70 ± 2,37***	91,3 ± 2,37***
ВГВ	1,49 ± 0,17***	0,26***	61,54 ± 2,18***	37,01 ± 1,81***	1,43 ± 0,74***	6,95 ± 1,66***	93,05 ± 1,66***

Примітка. Достовірність різниці порівняно з показниками контрольної групи: * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,01$.

слідження мікрогетерогенності орозомукоїду є перспективним напрямком пошуку специфічних діагностичних маркерів патологічних станів.

ВИСНОВКИ

1. Рівень АГП підвищується у 2–4 рази у сироватці крові у пацієнтів з гострими запальними процесами та онкозахворюваннями різного гістогенезу.

2. При злоякісних новоутвореннях лімфоїдної тканини (лейкемії, лімфоми) рівень АГП достовірно вищий, ніж при солідних пухлинах ПДЗ і при множинній мієломі.

3. У пацієнтів із ГВГ та пухлинами ПДЗ має місце достовірне підвищення вмісту поліантенних структур у складі АГП.

4. Відсутність глікоформи АГП, що сильно зв'язується з ConA, є характерною особливістю при пухлинах ПДЗ.

5. РНА-L-зв'язуюча здатність АГП при гострих пневмоніях достовірно нижче як порівняно із нормою, так із SIRS.

ЛІТЕРАТУРА

1. Willem VD, Brinkman-Van der Linden, Els CM, *et al.* Glycosylation of α 1-Acid Glycoprotein (Orosomucoid) in Health and Disease: Occurrence, Regulation and Possible Functional Implications. *Tren Glycos Glycotechnol* 1998; **10** (53): 235–45.

2. Олейников ВА, Ковнер МА, Куделина ИА и др. Роль углеводной части α -кислого гликопротеина в структурной организации его полипептидной цепи. Исследование методами спектроскопии кругового дихроизма и комбинационного рассеяния. II съезд биофизиков России. Тезисы. Москва, 1999 (раздел 1: Структура и динамика белков и их комплексов).

3. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. α -Acid Glycoprotein Levels in Human Immunodeficiency Virus-Infected Subjects on Antiretroviral Regimens. *Biochim Biophys Acta*. 2000; **1482**: 157–71.

4. Theilgaard-Mönch K, Jacobsen L, Rasmussen T, *et al.* Highly glycosylated α 1-acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils. *J Leuk Biol* 2005; **78**: 462–70.

5. Handerson T, Pawelek J. β 1,6-branched Oligosaccharides and Coarse Vesicles: A Common, Pervasive Phenotype in Melanoma and Other Human Cancers. *Cancer Res* 2003; **63** (17): 5363–9.

6. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1473**: 21–34.

7. Orczyk-Pawłowicz M, Hirnle L, Kałnik-Prastowska I. Alterations of N-glycan branching and expression of sialic acid on amniotic fluid α -1-acid glycoprotein derived from second and third trimesters of normal and prolonged pregnancies. *Clin Chim Acta* 2006; **367** (1–2): 86–92.

8. Антоноук ВО. Лектини (глава у монографії). Львів: Кварт, 2005. 550 с.

9. Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumors. *Immunol Cell Biol* 2005; **83**: 429–39.

10. Ryden I, Pahlsson P, Lindgren S. Diagnostic Accuracy of α 1-Acid Glycoprotein Fucosylation for Liver Cirrhosis in Patients Undergoing Hepatic Biopsy *Clin Chem* 2002; **48**: 2195–201.

MICROHETEROGENEITY OF ALPHA ACID GLYCOPROTEIN IN NEOPLASM AND INFLAMMATORY PROCESSES

N.I. Steklenyova, T.P. Nikolaenko, A.I. Shevtsova, A.Z. Brazaluk, K.Y. Lytvyn

Summary. Blood serum of 71 patients with neoplasm or inflammatory processes was tested for contents and glycosylation of alpha acid glycoprotein. Significantly (2 to 4 times) increased AAG levels were found in patients with acute inflammation and cancer. Changes in the structure of the AAP correlated with the nature of disorder. Patients with viral hepatitis and malignancies in the pancreaduodenal area featured a significant increase in the content of APP with polyantenna structures. At the same time, lack of AAP glycoform which is firmly linked with concanavallin A is a specific feature of mechanic biliousness caused by malignancies. PHA-L-linking capacity of AAP in out-patient pneumonia is considerably lower compared to both normal control and systemic inflammatory response syndrome.

Key Words: alpha acid glycoprotein, glycosilation, concanavallin A, phytohemagglutinin L, inflammatory processes, malignancies in the pancreaduodenal area, leukaemia, lymphoma, multiple myeloma.

Адреса для листування:

Стекленьова Н.І.

49052, Дніпропетровськ, вул. Орловська 27, кв. 17

E-mail: stekleneva@bk.ru