

**І.В. Машейко,  
О.З. Бразалук**

## ДІАГНОСТИЧНА ЦІННІСТЬ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ТА ФУКОЗИЛЬОВАНОСТІ АЛЬФА-1-КИСЛОГО ГЛІКОПРОТЕЇНУ ПРИ ХРОНІЧНИХ МІЄЛОЛЕЙКОЗАХ

*Дніпропетровська державна медична академія  
кафедра біохімії, медичної та фармацевтичної хімії  
(зав. – д. біол. н., проф. О.З. Бразалук)*

**Ключові слова:**  $\alpha_1$ -кислий глікопротеїн, фукозилізованість, еритремія, хронічний мієлоїдний лейкоз, сублейкемічний мієлоз, лектин-ферментний аналіз  
**Key words:**  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, fucosylation, erythremia, myeloma, subleukemic myelosis, lectin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

**Резюме.** Проведено дослідження содержания и степени афинности фукозоспецифических лектинов AAL, LCA и LABA к углеводным детерминантам  $\alpha_1$ -кислого гликопротеина плазмы крови при хронических миелолейкозах (эритремия, миеломная болезнь и сублейкемический миелоз). Установлено, что при эритремии и миеломной болезни происходит достоверное снижение концентрации и степени фукозиллизованности АГП по сравнению с нормой за счёт коровой и терминальной фукозы, а при сублейкемическом миелозе, напротив, наблюдается увеличение содержания терминальной фукозы, что может свидетельствовать о постепенной миелоидной метаплазии костного мозга и паренхиматозных органов.

**Summary.** The plasma concentration and the degree of affinity of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein to fucose-specific lectins AAL, LCA and LABA in proliferative blood diseases (erythremia, myeloma and subleukemic myelosis) were investigated. It was established that in erythremia and myeloma disease a reliable decrease of plasma level and fucosylation of  $\alpha_1$ -acid as compared to norm due to core and terminal fucose content takes place, and by contrast, in subleukemic myelosis increase of terminal fucose content occurs; it may testify to a gradual myeloid metaplasia of the bone marrow and parenchymal organs.

Білок гострої фази  $\alpha_1$ -кислий глікопротеїн (АГП, орозомукоїд) є одним із найбільш гетерогенних глікопротеїнів плазми крові з молекулярною масою від 35-37 kDa до 41-43 kDa, що залежить від структури вуглеводного компоненту та місця синтезу [5,9]. Єдиний поліпептидний ланцюг АГП складається із 183 амінокислот та стабілізований двома дисульфідними зв'язками між залишками цистеїну ( $CYS^5-CYS^{147}$  та  $CYS^{72}-CYS^{164}$ ) [14]. Структурно-функціональною особливістю АГП є значний ступінь глікозилізованості — п'ять N-гліканів комплексного типу, що приєднані до залишків аспарагіну та складають 41-45% від загальної молекулярної маси [9]. АГП властивий від'ємний заряд ( $pI=2,8-3,8$ ), зумовлений значним вмістом сіалових кислот ( $\approx 12\%$ ) [5,15]. У крові орозомукоїд присутній у вигляді декількох молекулярних форм, ідентичних за первинною послідовністю поліпептидного ланцюга, але різних за складом вуглеводних радикалів і, відповідно, за біологічною активністю [4].

АГП синтезується переважно у печінці, в осередках пухлинного росту [11], а також мієлоцитами та поліморфноядерними нейтрофілами [10]. Посттрансляційні модифікації вуглеводної

частини залежать від місця синтезу та характеру патологічного процесу і зумовлюють гетерогенність глікозилування АГП. Так, орозомукоїд, що секретується активованими нейтрофілами, має більшу молекулярну масу за рахунок підвищення фукозилізованості гліканів та наявності полілактозамінних залишків [13]. У нормі вуглеводні детермінанти АГП містять бі-, три- та тетраантенні N-глікани. При новоутвореннях відбувається підвищення експресії 1,4- та 1,6-розгалужених три- та тетраантенних структур [8].

Таким чином, концентрація і співвідношення глікоформ АГП, що циркулюють у крові, залежить від джерел його синтезу та у певній мірі відображає характер патологічного процесу.

Метою даної роботи було дослідження змін концентрації та фукозилізованості  $\alpha_1$ -кислого глікопротеїну при хронічних мієлолейкозах (еритремія, хронічний мієлоїдний лейкоз та сублейкемічний мієлоз).

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Загалом обстежено 27 хворих із хронічними мієлолейкозами. Клінічне обстеження пацієнтів проводили у відповідності до стандартів медичної допомоги в умовах спеціалізованого ста-

ціонару — гематологічного відділення комунального закладу "Міська багатопрофільна клінічна лікарня №4", м. Дніпропетровськ. Обстежені хворі були розподілені на такі групи: 1 - поліцитемія (еритремія) (n=16), 2 - хронічний мієлоїдний лейкоз (мієломна хвороба) (n=14), 3 - сублейкемічний мієлоз (n=18). До групи контролю ввійшли 22 здорові донори (група 4).

Концентрацію АГП визначали методом імунодоту з використанням поліклональних специфічних антитіл (Lifespan Bioscience, USA) та подальшою обробкою отриманих даних за допомогою програми GelProAnalyser.0.32. Характер фукозилзованості вуглеводних детермінант

АГП досліджували лектин-ферментним аналізом, використовуючи фукозоспецифічні лектини (табл.): алеврії оранжевої (*Aleuria aurantia lectin, AAL*), сочевиці (*Lens culinaris agglutinin, LCA*) та кори золотого дощу (*Laburnum anagyroides bark agglutinin, LABA*), що були кон'юговані з пероксидазою хрому в нашій лабораторії за методикою Nakane у модифікації Луцика [2]. Ступінь взаємодії фукозоспецифічних лектинів з вуглеводними детермінантами АГП оцінювали як відсоток зв'язування відповідного лектину відносно норми у перерахунку на концентрацію даного глікопротеїну.

**Характеристика фукозоспецифічних лектинів AAL, LCA та LABA (за Антонюк В.О. [1])**

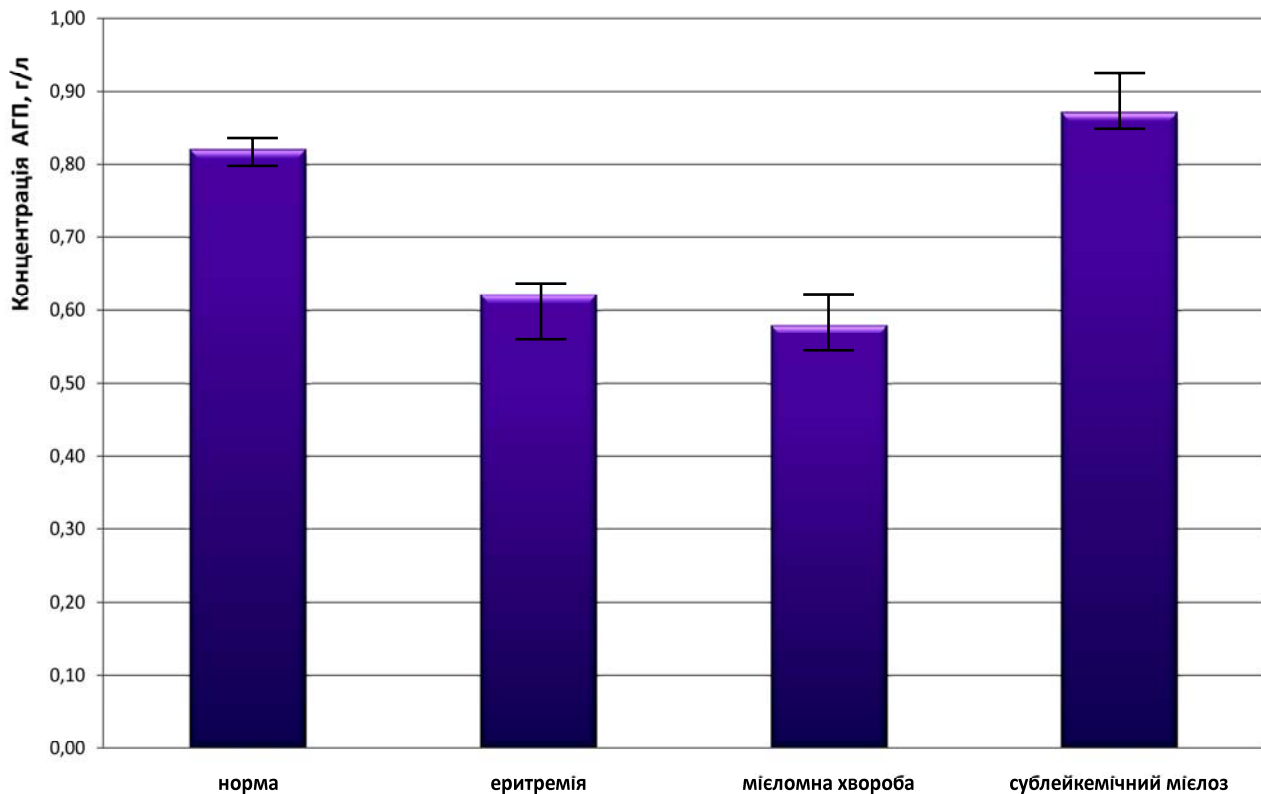
Назва лектина	Моносахаридна специфічність	Олігосахаридна специфічність
Лектин насіння сочевиці ( <i>Lens culinaris agglutinin, LCA</i> )	L-фукоза ( $\alpha_{1-6}$ )  триманозид Man( $\alpha_{1-3}$ )-Man( $\beta_{1-4}$ )- Man( $\alpha_{1-6}$ )	Gal( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc( $\beta_{1-2}$ )-Man( $\alpha_{1-3}$ )  Man( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc-R  Gal( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc( $\beta_{1-2}$ )-Man( $\alpha_{1-6}$ )
Лектин алеврії оранжевої ( <i>Aleuria aurantia lectin, AAL</i> )	L-фукоза ( $\alpha_{1-3}$ )  L-фукоза ( $\alpha_{1-6}$ )	Gal( $\beta_{1-4}$ )-Fuc( $\alpha_{1-3}$ )-Gal( $\beta_{1-4}$ )-Glc  GlcNAc( $\beta_{1-4}$ )-Fuc( $\alpha_{1-6}$ )-GlcNAc
Лектин кори золотого дощу ( <i>Laburnum anagyroides bark agglutinin, LABA</i> )	термінальні залишки L-фукози ( $\alpha_{1-2}$ )	Fuc( $\alpha_{1-2}$ )-Gal( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc( $\beta_{1-3}$ )  Gal( $\beta_{1-3}$ )-GalNAc-R  Fuc( $\alpha_{1-2}$ )-Gal( $\beta_{1-4}$ )-GlcNAc( $\beta_{1-6}$ )

Всі обстежені давали письмову інформовану згоду на участь у дослідженні. Статистична обробка даних виконана за допомогою пакета програм "Статистика 6.0". Достовірність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

При мієломній хворобі та еритремії було встановлено достовірне зниження концентрації АГП плазми крові у порівнянні з нормою. Навпаки, при сублейкемічному мієлозі концентрація АГП перебуває у межах норми (рис. 1.).

Ступінь взаємодії фукозоспецифічних лектинів з N-гліканами АГП залежав від типу патології та афінності відповідного лектину. Так, при сублейкемічному мієлозі ступінь взаємодії з AAL практично не змінювався, але знижувався при еритремії та мієломній хворобі на 22,19% та 28,97% відповідно. Також для сублейкемічного мієлозу характерним було посилення взаємодії з фукозоспецифічними лектинами LCA та LABA (на 19,09% та 15,03%) порівняно з нормою.



**Рис. 1. Концентрація АГП у плазмі крові при хронічних мієлолейкозах**

Дещо інша картина спостерігалась у першій та другій групах. Так, у хворих на еритремію ступінь взаємодії з LCA та LABA знижувався на 21,51% та 27,92%, при мієломній хворобі — знижувався на 25,85% та 29,73% відповідно (рис. 2.).

Таким чином, при еритремії та мієломній хворобі профілі фукозильованості за лектинами AAL, LCA та LABA подібні.

Молекула АГП містить п'ять сайтів приєднання N-гліканів комплексного типу, що становлять до 45% від загальної молекулярної маси й зумовлюють його біологічну активність. Відомо, що характер глікозильованості  $\alpha$ 1-кислого глікопротеїну залежить від видової приналежності, місця синтезу та фізіологічного стану організму.

Для дослідження ступеня фукозильованості АГП при мієлопроліферативних захворюваннях

крові було обрано найбільш інформативні фукозоспецифічні лектини: AAL, LCA та LABA.

Згідно з отриманими даними, можна зробити висновок, що при еритремії та мієломній хворобі вміст та ступінь фукозильованості АГП значно знижується, що є характерним для даної патології.

Порівнюючи ступінь зв'язування АГП з лектинами LCA та AAL, ми виявили, що лектин сочевиці мав більшу афінність до АГП. Це явище можна пояснити тим, що лектин сочевиці має два сайти зв'язування з N-гліканами — з коровим триманозидом та з коровою  $\alpha_{1\rightarrow6}$  фукозою [12], а лектин алеврії оранжевої має специфічність тільки до фукози в положенні  $\alpha_{1\rightarrow6}$  та  $\alpha_{1\rightarrow3}$ . Згідно з літературними джерелами (Matsumura K., 2007), збільшення вмісту корової  $\alpha_{1\rightarrow6}$  фукози пов'язане із підвищенням активності фукозилтрансферази VIII при малігнізації [7].

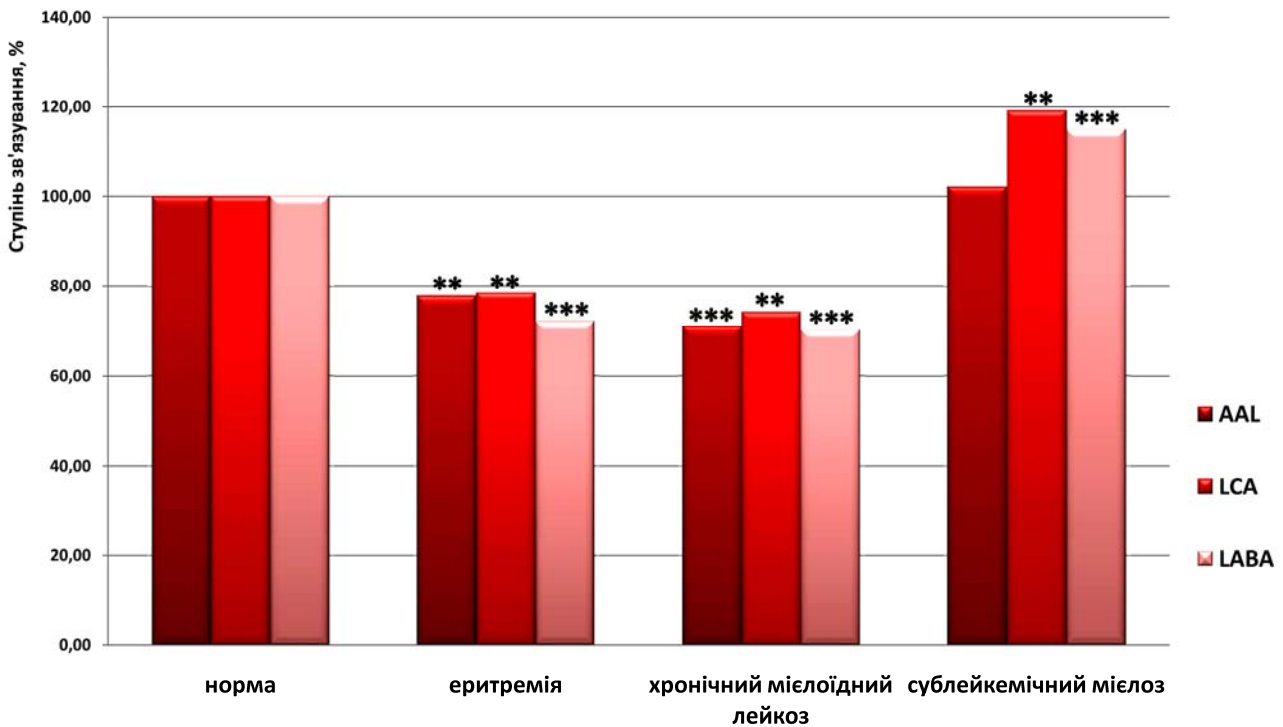


Рис. 2. Ступінь взаємодії АГП з фукозоспецифічними лектинами при хронічних мієлолейкозах

Примітка: \*\*\* $p < 0,001$  \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  – достовірна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи

Дослідженнями взаємодії LABA, який специфічно реагує з термінальною  $\alpha_{1-2}$  фукурою, було виявлено зниження ступеня зв'язування даного лектину з АГП при еритремії та мієломній хворобі й підвищення при сублейкемічному мієлозі. Виходячи з цього, є підстави стверджувати про зміну активності відповідної фукозилтрансферази при хронічних мієлолейкозах. Слід зазначити, що поява у складі вуглеводних детермінант Н- та Льюїс антигенів ( $Le^b$  та  $Le^y$ ), які містять термінальну  $\alpha_{1-2}$  фукозу, свідчить про несприятливий клінічний прогноз при онкопатології [6].

Зважаючи на специфічність використаних лектинів (таб. 1), для встановлення характеру фукозильованості АГП найбільш інформативним є аналіз його взаємодії з ААЛ та LABA. Так, при еритремії та мієломній хворобі рівень термінальної,  $\alpha_{1-6}$ ,  $\alpha_{1-3}$  та корової фукози N-гліканів АГП знижується. Навпаки, при сублейкемічному мієлозі вміст термінальної та корової фукози збільшується, а рівень фукози, розташованої у положенні  $\alpha_{1-6}$  та  $\alpha_{1-3}$ , знаходиться в межах норми.

Еритремія та мієломна хвороба – доброякісні пухлини крові з тривалим перебігом. На відміну від них, сублейкемічний мієлоз відноситься до лейкозів, що характеризуються підвищеною

поліморфно-клітинною мієлопроліферацією за типом панмієлозу, який супроводжується прогресуючим мієлофіброзом та остеомієлосклерозом з мієлоїдною метаплазією кісткового мозку та паренхіматозних органів [3]. Незважаючи на те, що еритремія, хронічний мієлоїдний лейкоз та сублейкемічний мієлоз є доброякісними пухлинами, профілі взаємодії фукозоспецифічних лектинів з орозомукоїдом за даної патології різняться. Таким чином, ми дійшли висновку, що зміни у N-гліканах АГП подібні при еритремії та хронічному мієлоїдному лейкозі. Ірентуючись на отриманих даних, можна зробити висновок, що зниження фукозильованості олігосахаридного компоненту АГП є характерною рисою доброякісних мієлолейкозів. У свою чергу, підвищення експресії термінальних залишків  $\alpha_{1-2}$  та корової фукози може свідчити про прогресуючу мієлоїдну метаплазію кісткового мозку та паренхіматозних органів при сублейкемічному мієлозі. Таким чином, урахування даних показників може бути використано як додатковий інформаційний критерій у диференціальній діагностиці хронічних мієлолейкозів.

#### ВИСНОВКИ

1. Концентрація АГП у плазмі крові знижується при еритремії та хронічному мієлоїдному лейкозі.

2. Підвищення експресії термінальної  $\alpha 1 \rightarrow 2$  та корової фукози на N-гліканах АГП є корисним показником мієлоїдної метаплазії кісткового мозку та паренхіматозних органів.

3. Профілі фукозилуваності гліканів АГП подібні при еритремії та хронічному мієлоїдному лейкозі.

4. Визначення ступеня зв'язування вуглеводних детермінант АГП з лектинами алеврії оранжевої, сочевиці та кори золотого дощу може бути використано як додатковий інформаційний критерій у диференціальній діагностиці хронічних мієлолейкозів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: Кальварія, 2005.- 554с.

2. Луцик М.Д., Детюк Е.С., Луцик Н.Д. Лектини в гистохимії / Под ред. Е.Н. Панасюка. - Львов: Вища школа, 1989.- 144 с.

3. Особенности структурной организации костного мозга при различных стадиях миелофиброза с миелоидной метаплазией / Кабаченко И.Н., Бебешко В.Г., Грабовой А.Н. [и др.] // Вісник морфології.- 2005.- №2.- С. 164-168.

4. Роль углеводной части  $\alpha 1$ -кислого гликопротеина в структурной организации его полипептидной цепи. Исследование методами спектроскопии кругового дихроизма и комбинационного рассеяния / Олейников В.А., Ковнер М.А., Куделина И.А. [и др.] // II съезд биофизиков России. Раздел 1: Структура и динамика белков и их комплексов.- 1999.

5.  $\alpha 1$ -Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties / Hocheppied T., Berger F, Baumann H, Libert C.// Cytokine Growth Factor Reviews. - 2003. – Vol.11. – P.25-34.

6. Becker D., Lowe J. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals // Glycobiology.- 2003.- Vol.13, N 7.- P. 41-53.

7. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *Aspergillus oryzae*: a novel probe for core fucose / Matsumura K., Higashida K., Ishida H. [et al.] // J. Biol. Chem.- 2007.- Vol.282, N 21.- P. 15700-15708.

8. Dennis J.W., Granovsky M., Warren C.E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression // Biochimica Biophysica Acta.- 1999.- Vol.1473.- P. 21-34.

9. Glycosylation of  $\alpha 1$ -Acid Glycoprotein (Oro-

somucoid) in Health and Disease: Occurrence, Regulation and Possible Functional Implications / Van Dijk Willem, Brinkman-Van der Linden, Els C.M. [et al.] // Trends in Glycoscience and Glycotechnology.- 1998.- Vol.10, №53.- P.235-245.

10. Highly glycosylated  $\alpha 1$ -acid glycoprotein is synthesized in myelocytes, stored in secondary granules, and released by activated neutrophils / Kim Theilgaard-Monch, Lars C. Jacobsen, Thomas Rasmussen [et al.] // J. Leukocyte Biology.- 2005.- Vol.78.- P. 462-470.

11. Fournier T., Medjoubi N., Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein // Biochim. Biophys. Acta.- 2000.- Vol.1482.- P.157-171.

12. Improvement of the lectin-antibody enzyme immunoassay of the alpha-fetoprotein carbohydrate chain for automation with the enzyme immunoassay robot / Tamano K., Sugiura M., Natsuki J. [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem.- 2005.- Vol.69, N 8.- P. 1616-1619.

13. Poland D.C. Neutrophils synthesize and can release a specifically fucosylated glycoform of alpha-1-acid glycoprotein which is a very potent inhibitor of the classical route of complement. Tissue specific fucosylation of alpha-1-acid glycoprotein and its potency to inhibit the classical route of complement // Amsterdam: PhD thesis, Vrije Universiteit, 2002.- P. 71-88.

14. Structure of human  $\alpha 1$ -acid glycoprotein and its high-affinity binding site / Kopecky V., Ettrich R, Hofbauerov K., Baumruka V. // Biochemical and Biophysical Research Communications.- 2003.- Vol.300.- P. 41-46.

15. Zsilaa F., Iwao Y. The drug binding site of human  $\alpha 1$ -acid glycoprotein: Insight from induced circular dichroism and electronic absorption spectra // Biochimica Biophysica Acta.- 2007.- Vol.1770.- P. 797-809.

