

УДК 547.631.7:577.15:616.155.392-036.1-08:615.277

СИРОВАТОЧНИЙ РІВЕНЬ СІАЛОВИХ КИСЛОТ ТА АКТИВНІСТЬ НЕЙРАМІНІДАЗИ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОГО ЛІМФОЛЕЙКОЗУ ТА НА ФОНІ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ

Маслак Г.С., Костюк О.В., Бразалук О.З.

*ДЗ «Дніпропетровська медична академія», Дніпропетровськ, Україна
E-mail: maslak_anna@mail.ru*

Досліджено концентрацію загальних сіалових кислот (СК) і активність нейрамінідази при хронічному лімфоїдному лейкозі (ХЛЛ) та за умов хіміотерапевтичного лікування (СОР-терапія). Показано достовірне підвищення цих параметрів при ХЛЛ відносно групи гематологічно здорових волонтерів. Проведення СОР-терапії призводить до нормалізації рівня СК та активності нейрамінідази в сироватці хворих, між цими показниками визначається кореляційний зв'язок, відсутній до лікування. Через 2 місяці після проведення хіміотерапевтичного лікування хворих на ХЛЛ рівень загальних СК зростав, а активність нейрамінідази знижувалась, і між ними існував достовірний негативний кореляційний зв'язок. Вперше показаний вплив хіміотерапевтичного лікування на рівень сіалових кислот та активність нейрамінідази у хворих на хронічний лімфолейкоз. Отримані дані можуть бути використаними для оцінки реакції організму людини на СОР-терапію.

Ключові слова: сіалові кислоти, активність нейрамінідази, хронічний лімфолейкоз, СОР-терапія.

ВСТУП

Сіалові кислоти (СК) є кінцевими вуглеводами гліканових структур глікопротеїнів, гліколіпідів та гангліозидів, що беруть участь у різних фізіологічних процесах [1]. Вони з'являються під дією сіалідаз: ендо- α -нейрамінідаз, що відщеплюють внутрішні залишки сіалових кислот або екзо- α -нейрамінідаз, що гідролізують термінальні залишки СК [3]. Таке відщеплення СК (десіалювання) за умовою патологічного процесу істотно впливає на хід багатьох метаболічних процесів, таких як диференціювання клітин, клітинний ріст та апоптоз, за рахунок зміни конформації глікокон'югатів і маскування біологічних сайтів функціональних молекул [2].

В літературі добре описані основні типи сіалідаз (Neu1, Neu2, Neu3 та Neu4), що мають цитозольну, мембранну або лізосомну локалізацію [4]. Доказано, що порушення в експресії сіалідаз безумовно впливають на процеси метастазування та прогресування багатьох пухлин і є чинниками, що визначають злоякісність процесу [5]. Внаслідок цього в сироватці може значно змінюватись вміст вільних сіалових кислот [6]. Так, за думкою Hamad A.W.R. та інших, підвищення рівню ліпід-зв'язаних сіалових кислот в сироватці хворих на гостру лімфоїдну лейкемію може бути маркером цього захворювання [7].

Хронічний лімфолейкоз (ХЛЛ) є найбільш розповсюдженим пухлинним захворюванням лімфоїдної тканини, що часто починається без виражених клінічних симптомів і діагностується при випадковому дослідженні крові хворого [8]. Тому безумовно важливими є дослідження направлені на зрозуміння процесів, що супроводжують це захворювання для встановлення додаткових діагностичних критеріїв.

Метою роботи було дослідження рівня загальних сіалових кислот та активності нейрамінідази при хронічному лімфоїдному лейкозі та за умов хіміотерапевтичного лікування (СОР-терапія).

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження слугувала сироватка крові хворих на ХЛЛ ($n = 20$) у віці 58-66 років, які в залежності від терміну лікування склали три групи: група I - до лікування; група II - перша доба з початку проведення курсу стандартної хіміотерапії по схемі СОР; група III - через два місяці після проведення першого курсу стандартної хіміотерапії по схемі СОР. Групу контролю склали гематологічно здорові волонтери ($n = 20$) у віці від 55 до 65 років. Клінічне обстеження пацієнтів проводили у відповідності зі стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару - гематологічного відділення комунального закладу «Міська багатoproфільна клінічна лікарня № 4», м. Дніпропетровськ. Всі обстежувані в письмовому вигляді давали згоду на участь у дослідженні.

Рівень загальних сіалових кислот визначали за допомогою «СіалоТест» (НПЦ Еко-Сервіс, Росія). В пробірку вносили по 1мл гідролізуючого реагенту, 2мл дистильованої води і 0,6мл сироватки. Вміст пробірок ретельно перемішували і ставили на водяну баню на 5 хвилин, потім центрифугували при 3000об/хв., на протязі 6 хвилин. Відбирали 2мл супернатанту, додавали 0,4мл кольороутворюючого реагенту, інкубували на доведеній до кипіння водяній бані впродовж 15 хвилин, охолоджували в холодній воді, додавали 2мл дистильованої води і перемішували. Вимірювали оптичну густину $E_{\text{зразка}}$ проти дистильованої води. Вміст сіалових кислот (С) розраховувався за формулою: $C = E_{\text{зразка}} * K$ моль/л. Аналіз проводили на фотоелектрокалориметрі при довжині хвилі 540нм, кювету використовували з довжиною оптичного шляху 10мм. Перед аналізом зразків визначали коефіцієнт перерахунку (К). Для цього на пристрої виміряли оптичну густину (Е) калібратора проти дистильованої води. Розраховували коефіцієнт перерахунку за формулою: $K = 2/E$, де 2 – концентрація сіалових кислот в калібраторі, моль/л.

Активність нейрамінідази визначали за аглютинацією еритроцитів лектином арахісу [9]. В епіндорфи вносили по 50 мкл попередньо відмитої суспензії 10% еритроцитів людини I групи крові, додавали 50 мкл плазми та 100 мкл 0,2М ацетатного буферного розчину з рН=5,0. Залишали на 2 години при 30 °С в термостаті. Після чого центрифугували 30 секунд. Відбирали надосадову рідину додаючи 200 мкл ЗФР-BSA. Знову повторювали центрифугування та додавали 250 мкл ЗФР-BSA після чого проводили калібровку. Як стандарт використовували нейрамінідазу із *Vibrio Cholerae* (Serva, Heidelberg, Germany), калібровку

здійснювали в діапазоні активностей нейрамінідази від 10 до 0,05мU/мл (міліодиниць на мілілітр) та в діапазоні концентрацій лектину від 2 до 15,6 мкг/мл. Одиниця активності нейрамінідази (U) дорівнює активності ферменту, яка вивільнить 1 мкМ N-ацетилнейрамінової кислоти за 1 хвилину при рН=5,0 та температурі 37°C, використовуючи як субстрат NAN-лактозу або бичачий підшеплений муцин. Отримані результати відцифрували за допомогою програми GelProAnalyser 32.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Statistics 6.0. Достовірність відмінностей в групах досліджуваних встановлювали за допомогою t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В групі хворих на ХЛЛ до проведення лікування спостерігається достовірне ($p < 0,05$) збільшення рівня сіалових кислот на $37,5 \pm 2,1\%$ порівняно з нормою (див табл.1). В першу добу після проведення хіміотерапії по схемі COP визначалося зниження на $30,1 \pm 1,9\%$ ($p < 0,05$) рівня сіалових кислот в порівнянні з їх рівнем до лікування. Визначений рівень загальних СК був в межах норми і не відрізнявся від зафіксованого в групі гематологічно здорових волонтерів. В групі хворих, що отримували хіміотерапевтичне лікування по схемі COP та здавали кров через два місяці після її проведення визначалося підвищення рівня СК на $19,2 \pm 0,6\%$ в порівнянні з нормою. Концентрація сіалових кислот в групі III також зростала на $12 \pm 0,5\%$ відносно значень, отриманих в групі II, але була менше на $15 \pm 0,45\%$ ніж до лікування (див. рис.1).

Таблиця 1.

Рівень загальних сіалових кислот та активність нейрамінідази в сироватці крові здорових волонтерів та хворих на хронічний лімфо лейкоз

№	Група хворих, кількість досліджень	Концентрація сіалових кислот мг/100мл	Активність нейрамінідази мU/мл	Коефіцієнт кореляції, r
1	Здорові донори, n=20	$63,7 \pm 10,25$	$53,78 \pm 12,19$	-0,828
2	Група I, n=20	$87,66 \pm 9,18^*$	$67,48 \pm 5,68^*$	0,472
3	Група II, n=20	$67,37 \pm 9,41$	$60,01 \pm 12,19$	-0,864
4	Група III, n=20	$75,97 \pm 8,8$	$43,86 \pm 6,83^*$	0,705

Примітка: * - достовірна різниця у порівнянні з контрольною групою при $p < 0,05$.

Активність нейрамінідази за умов ХЛЛ зростала в порівнянні з контрольною групою на $25,4 \pm 1,6\%$, а в першу добу проведення хіміотерапії по схемі COP було зафіксоване зниження цього показника майже до нормальних значень. В групі III визначалося зниження активності нейрамінідази на $19,6 \pm 1,1\%$ відносно норми та на $27,7 \pm 2,0\%$ відносно групи II (див.рис.1).

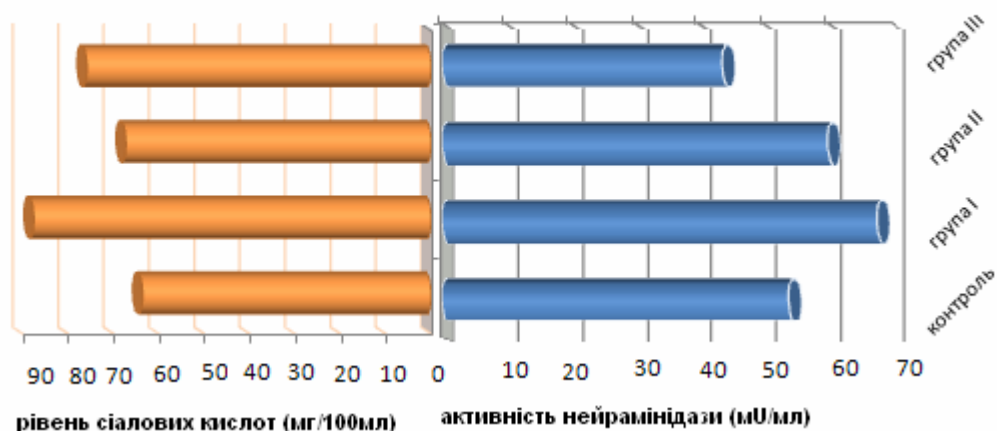


Рис. 1. Зміни концентрації сіалових кислот та активності нейрамінідази за умов СОР-терапії.

Кореляційний аналіз показав існування достовірного позитивного зв'язку між рівнем загальних сіалових кислот та активністю нейрамінідази в групі гематологічно здорових донорів, що є очікуваним та підтверджується в роботах інших авторів [6]. За умов хронічного лімфолейкозу коефіцієнт кореляції Пірсона (r) був не достовірним (0,472), але мав значення -0,864 та 0,705 в групі II та групі III, відповідно.

Рівень сіалових кислот досліджений при багатьох захворюваннях: за даними Sabzwari M. запальні процеси супроводжуються підвищеним рівнем СК [10], а при онкологічних захворюваннях такі зміни позитивно корелюють зі ступенем метастазування [11]. Результати нашої роботи свідчать, що за умов хронічного лімфолейкозу в сироватці крові спостерігається достовірне підвищення концентрації загальних сіалових кислот, що можливо має вплив на течію ХЛЛ. За даними Varki A. сіалові кислоти відіграють важливу роль у забезпеченні імунологічного контролю та можуть маскувати антигенні детермінанти пухлинних клітин і, таким чином, сприяти розвитку пухлин [12].

На сьогоднішній день у ссавців описано чотири типи сіалідаз, експресія яких змінюється по різному при канцерогенезі [5]. Відомо, що лізосомальні нейрамінідази приймають участь в регулюванні вільного росту пухлинних клітин (anchorage-independent growth), а, ті, що знаходяться на плазматичних мембранах стимулюють супресію апоптозу [13]. Так, зміни мембран-асоційованої активності сіалідази (Neu3) відносно гангліозидів асоціюється із пухлинною трансформацією [14]. В той час, як в літературі обговорюються значення та роль в карценогенезі клітинних нейрамінідаз, дуже мало свідчень про їх розчинні форми. За даними Vilyu R. та інших, за умов множинної мієломи спостерігається підвищення IgG-

опосередкованої нейрамінідазної активності в плазмі крові хворих [15]. Ми дослідили активність нейрамінідази в сироватці крові хворих на ХЛЛ та показали достовірне підвищення її значення. Слід відзначити, що якщо в нормі завжди спостерігається зв'язок між рівнем СК та активністю нейрамінідази [6], то при ХЛЛ цей взаємозв'язок не спостерігався, що сполучається із висновками інших дослідників. Так, за даними Merat A. та інших, підвищення сироваточного рівня СК не корелює із активністю нейрамінідази, але може бути використане як показник важкості течії діабету та кардіоваскулитів [16]. Експресія сіалідаз значно змінюється за умов онкопроліферативного процесу. Так, за даними Miyagi T. експресія Neu3 часто підвищується, а Neu1, Neu2, та Neu4 знижується [5]. Raval G.N. із співвіваторами визначає, що підвищений рівень СК пов'язаний із підвищенням активності сіалілтрансфераз за умов раку молочної залози [17]. Саме порушення експресії сіалілтрансфераз корелює із процесами онкогенезу, пухлинної прогресії та метастазуванням лімфовузлів [18]. А за даними Mondal S. та інших підвищений рівень mRNA ензимів hST6Gal I та hST3Gal V позитивно корелює із високим ризиком виникнення гострої лейкемії [19].

Вперше нами показано вплив хіміотерапевтичного лікування на сироваточний рівень сіалових кислот та активність нейрамінідази. Відомо, що хіміотерапевтичне лікування по схемі COP, що є затвердженою МОЗ України (наказ № 647 від 30.07.2010; хронічний лімфоїдний лейкоз С91.1) призначається хворим за умов прогресування хвороби по розгорнутій клініко-гематологічній картині, а при ремісії курси повторюються кожні 2 місяці на протязі року. Лікування спрямовано на зменшення проліферації лімфоїдних клітин, розмірів лімфатичних вузлів, селезінки та печінки, попередження виникнення рецидивів. За нашими даними COP-терапія призводить до нормалізації рівня СК та активності нейрамінідази. Крім того статистичний аналіз свідчить про існування кореляційного зв'язку між цими показниками, який є відсутнім до лікування, що може умовно свідчити про ефективність застосування цього виду терапії.

Через 2 місяці після проведення хіміотерапевтичного лікування хворих на ХЛЛ спостерігаються зміни досліджуваних показників. Так, в порівнянні із групою II визначається підвищення рівня загальних СК, в той час як активність нейрамінідази в кровотоці знижується. Слід відзначити, що між цими параметрами існує достовірний негативний кореляційний зв'язок, який свідчить про їх взаємозв'язок. Однією з причин того, що на фоні зниженої активності нейрамінідази концентрація сіалових кислот залишається підвищеною може бути порушення синтезу сіалідаз, а саме підвищення їх експресії. Так, за даними американських вчених, отриманих з використанням лінії клітин гострої В-лімфобластної лейкемії введення хіміотерапевтичних препаратів призводить до підвищення експресії галектину-3 та екстрацелюлярних сіалідаз [20]. Таким чином, подальші дослідження експресії ензимів на різних етапах лікування хронічного лімфолейкозу можуть допомогти в розкритті механізмів відповіді організму людини на введення хіміотерапевтичних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. За умов хронічного лімфоїдного лейкозу в сироватці крові визначається підвищення рівня загальних сіалових кислот на $37,5 \pm 2,1\%$ та зростання активності нейрамінідази на $25,4 \pm 1,6\%$.
2. В першу добу після проведення хіміотерапії за схемою COP нами спостерігалось зниження досліджуваних показників до значень, що фіксувалися у гематологічно здорових волонтерів.
3. Рівень сіалових кислот зростає, а активність нейрамінідази знижувалась у хворих через 2 місяці після лікування, що свідчить про чутливість цих показників та може бути використано для оцінки реакції організму людини на хіміотерапевтичне втручання.

Список літератури

1. Schauer R. Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man / R. Schauer // *Zoology* – 2004. – P. 49-64.
2. Bagriacik E.U. Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: the neuraminidase effect reconsidered *Glycobiology* / E.U. Bagriacik, K.S. Miller– 1999. – P. 267-275.
3. Pshezhetsky A.V. Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology *Prog / A.V. Pshezhetsky, M. Ashmarina // Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 69. – P. 81-114.
4. Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail / K.E. Lukong, V. Seyrantepe, K. Landry [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 46172-46181.
5. Sialidase significance for cancer progression. / T. Miyagi, K. Takahashi, K. Hata [et al.] // *Glycoconj J.* – 2012. – Vol. 29. – P. 567-577.
6. Sialic acid and sialidase activity in acute stroke. / L. Nanetti, A. Vignini, F. Raffaelli [et al.] // *Dis Markers.* – 2008. – Vol. 25. – P. 167-173.
7. Abdul Wahab R. Evaluation of lipid-bound sialic acid tumor marker in sera of acute lymphocytic (ALL) patients. / Abdul Wahab R. Hamad, Nazar G.A.Talabani // *J Bagh College of Dentistry.* – 2008. – Vol. 20. – P. 28-30.
8. Крячок И.А. Что нового в онкогематологии? (Обзор последних тенденций в диагностике и лечении лимфом). / И.А. Крячок // *Клиническая онкология.* – 2012. – № 7. – С. 1-3.
9. Viviane Nakano. A rapid assay of the sialidase activity in species of the *Bacteroides fragilis* group by using peanut lectin hemagglutination. / Nakano Viviane, Roxane Maria Fontes Piazza, Mario Julio Avila-Campos // *Экспресс-теста на сиалидазы деятельности в виды Bacteroides Anaerobe.* – 2006. – Vol. 12. – P. 238–241.
10. Sabzwari M. Serum sialic acid concentration and type II diabetes mellitus./ Dr. Mohammad Sabzwari, Dr.Muhammad Majeed, Dr.Mukhtar Ahmad // *Professional Med.* – 2006. – №4. – P. 508-510.
11. Chen S. Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. / S.Chen, M.Fukuda // *Methods Enzymol.* – 2006. – №416. – P. 371–380.
12. Varki A. Sialic acids in human health and disease. / A. Varki // *Cell press.* – 2008. – № 6. – P. 351-359.
13. Miyagi T. Aberrant expression of sialidase and cancer progression / T. Miyagi // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* – 2008. – Vol. 84. – P. 407-418.
14. Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. / Taeko Miyagi, Tadashi Wada, Kazunori Yamaguchi [et al.] // *Journal of Biochemistry.* – 2008. – Vol. 144. – P. 279-85
15. Antibody-Mediated sialidase activity in blood serum of patients with multiple myeloma. / R. Bilyy, A. Tomor, I. Mahorivska [et al.] // *Molecular Recognition.* – 2010. – P. 89-110.
16. Merat A. Serum Levels of Sialic Acid and Neuraminidase Activity in Cardiovascular, Diabetic and Diabetic Retinopathy Patients / A. Merat, R. Arabsolghar, J. Zamani, M.H. Roozitalab // *I JMS.* – 2003. – Vol. 28, No 3. – P. 23-34.

17. Clinical usefulness of alterations in sialic acid, sialytransferase and sialoproteins in breast cancer. / G.N. Raval, L.I. Parekh, F.P. Sha [et al.] // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2004. – Vol. 19, No 2. – P. 60-71.
18. Wan P.H. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialytransferases. / P.H. Wan // Journal of Cancer Molecules. – 2005. – No 2. – P. 73-81.
19. Mondal S. Elevated mRNA level of hST6Gal I and hST3Gal V positively correlates with the high risk of pediatric acute leukemia. / S. Mondal, S. Chandra, C. Mandal // Leuk Res. – 2010. – Vol. 34, No 4. – P. 463-470.
20. Nora Heisterkamp. Galectins and Pathologies: Role of Galectin-3 in the Communication between Leukemia Cells and the Microenvironment / Nora Heisterkamp, Fei Fei, John Groffen // ACS Symposium Series. – 2012. – Vol. 14. – P. 249–258.

Маслак А.С. Сывороточный уровень сиаловых кислот и активность нейраминидазы при хроническом лимфолейкозе и на фоне химиотерапевтического лечения / А.С. Маслак, О.В. Костюк, А.З. Бразалук // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С.105-111.

Исследована концентрация общих сиаловых кислот (СК) и активность нейраминидазы при хроническом лимфоидном лейкозе (ХЛЛ) и в условиях химиотерапевтического лечения (СОП-терапия). Показано достоверное повышение этих показателей при ХЛЛ по сравнению с группой гематологической здоровых волонтеров. Проведение СОП-терапии приводит к нормализации уровня СК и активности нейраминидазы в сыворотке крови, между этими показателями определяется корреляционная связь, которая отсутствует до лечения. Через 2 месяца после проведения химиотерапевтического лечения больных ХЛЛ уровень общих СК возрастал, а активность нейраминидазы снижалась, и между ними определялась отрицательная корреляционная связь. Впервые показано влияние химиотерапевтического лечения на уровень сиаловых кислот и активность нейраминидазы у больных хроническим лимфолейкозом. Полученные данные могут быть использованы для оценки реакции организма человека на СОП-терапию.

Ключевые слова: сиаловые кислоты, активность нейраминидазы, хронический лимфолейкоз, СОП-терапия.

Maslak G.S. Serum level of sialic acid and neuraminidase activity in chronic lymphocytic leukemia and background chemotherapy / G.S.Maslak, O.V.Kostyuk, O.Z.Brazaluk // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 105-111.

The concentration of total sialic acids (SC) and neuraminidase activity in chronic lymphoid leukemia (CLL) and under chemotherapy (COP therapy) was investigated. Significant increase in these parameters in CLL relative of hematological healthy volunteers was shown. Holding COP-therapy leads to normalization of SK and neuraminidase activity in serum of patients between these parameters defined correlation, no to treatment. After 2 months after chemotherapy in patients with CLL level of general insurance increased and decreased neuraminidase activity, and between them there was a reliable negative correlation. For the first time shows the influence of chemotherapy on the level of sialic acid and neuraminidase activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. These data can be used to assess the response of the human body at COP therapy.

Keywords: sialic acid, neuraminidase activity, chronic lymphocytic leukemia, CMO therapy.

Поступила в редакцию 26.01.2013 г.