

УДК 616.153.454-006-036.1:577.112.85

СОДЕРЖАНИЕ α -1 КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА И СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

А.С. Маслак, О.В. Костюк, И.В. Машейко, А.З. Бразалук

ГУ "Днепропетровская медицинская академия", Днепропетровск, Украина

Целью работы было исследование концентрации общих сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина в крови и моче в группах больных с эритремией и сублейкемическим миелозом. Содержание α -1 кислого гликопротеина в сыворотке и моче определяли методом иммунодота, а уровень сиаловых кислот - с помощью "Сиало-Тест" (НПЦ Эко-Сервис, Россия). В работе показано повышение уровня сиаловых кислот в сыворотке на $42,6 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$) и $41,5 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$), при эритремии и сублейкемическом миелозе, соответственно. В моче при данных патологиях концентрация сиаловых кислот возрастает почти в 2 раза ($p < 0,001$). Уровень α -1 кислого гликопротеина при эритремии снижается на $32,3 \pm 0,6\%$ в плазме крови и на $31,4 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$) в моче, и напротив, не отличается от нормы при сублейкемическом миелозе. Полученные данные могут быть использованы с целью раннего выявления и для проведения дифференциальной диагностики хронических миелолойкозов.

Ключевые слова: α -1 кислый гликопротеин, сиаловые кислоты, эритремия, сублейкемический миелоз.

Введение

К группе хронических миелопролиферативных заболеваний, генетически обусловленных нарушением процессов кроветворения, относят эритремию и сублейкемический миелоз. Истинная полицитемия (эритремия) характеризуется медленным прогрессирующим течением на протяжении нескольких лет, со склонностью к трансформации в более агрессивные формы миелолойкоза (сублейкемический миелоз). Вследствие этого, перед врачами-гематологами часто стоит задача поиска специализированных групп маркеров, изменение в содержании или соотношении которых поможет выявлять на ранних стадиях, а также проводить дифференциальную диагностику хронических миелолойкозов.

α -1 кислый гликопротеин - белок острой фазы, концентрация которого изменяется при многих воспалительных и опухолевых заболеваниях [3]. Поскольку большая часть его молекулы представлена углеводным компонентом, так называемой гликановой частью, то изменение её структуры при различных заболеваниях часто приводит к появлению у данного гликопротеина новых свойств [1]. Важнейшими составляющими гликанов α -1 кислого гликопротеина является наличие концевых N-ацетилнейраминовых остатков - сиаловых кислот. Повышенная сиалированность углеводных цепей способствует маскировке гликановых антигенных детерминант при онкологических процессах [13, 14]. Уменьшение количества концевых N-ацетилнейраминовых остатков обуславливает появление свободных сиаловых кислот в крови. В норме, как правило, в свободном виде сиаловые кислоты встречаются в незначительном количестве [2]. Общий уровень сиаловых кислот является суммой двух фракций: связанных с гликоконъюгатами и свободно циркулирующих в кровотоке, его определение даёт полную информацию об активности процессов сиалирования и десиалирования белков в организме [1]. Диагностическая ценность исследования данного параметра в различных биологических жидкостях, таких как кровь и моча, заключается в установлении характера биохимических изменений при определённом патологическом процессе. Целью работы было исследование изменения концентрации общих сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина в крови и моче в группах больных с эритремией и сублейкемическим миелозом.

Материалы и методы

Материалом исследования служила сыворотка крови и моча в следующих группах: больных эритремией ($n = 12$) в возрасте от 54 до 68 лет; больных сублейкемическим миелозом ($n = 12$) в возрасте от 48 до 65 лет; здоровых волонтеров ($n = 25$) в возрасте от 55 до 60 лет. Клиническое обследование пациентов проводили в соответствии со стандартами медицинской помощи в условиях специализированного стационара - гематологического отделения коммунального учреждения "Городская многопрофильная клиническая больница №4", г. Днепропетровск. Все обследуемые в письменном виде давали согласие на участие в исследовании.

Концентрацию α -1 кислого гликопротеина в сыворотке и моче определяли методом иммунодота с использованием поликлональных кроличьих антител к α -1 кислого гликопротеина, соответственно. Полученные данные обрабатывали с помощью программы GelPro-Analyser.0.32.

Уровень сиаловых кислот определяли с помощью "СиалоТест" (НПЦ Эко-Сервис, Россия). В пробирки вносили по 1мл гидролизующего реагента, по 2 мл дистиллированной воды и по 0,6 мл сыворотки. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и ставили на водяную баню на 5 минут, после чего центрифугировали 6 минут при 3000 об/мин. Отбирали 2 мл супернатанта, добавляли 0,4 мл цветообразующего реагента, инкубировали на кипящей водяной бане в течение 15 минут, охлаждали в холодной воде, добавляли 2 мл дистиллированной воды и перемешивали. Измеряли оптическую плотность $E_{\text{обр}}$ против дистиллированной воды. Содержание сиаловых кислот (С) рассчитывалось по формуле: $C = E_{\text{обр}} \cdot K$ моль/л. Анализ проводили на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм, кювету использовали с длиной оптического пути 10мм. Перед промеркой образцов определяли коэффициент пересчета (К). Для этого на приборе измеряли оптическую плотность (Е) калибратора против дистиллированной воды. Рассчитывали коэффициент пересчета по формуле: $K = 2/E$, где 2 - концентрация сиаловых кислот в калибраторе, моль/л. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistics 6.0. Достоверность различий в группах исследуемых устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Уровень общих сиаловых кислот в сыворотке крови и моче в группе здоровых волонтеров составил $637,48 \pm 123,7$ мг/л и $575,25 \pm 98,22$ мг/л, соответственно. Полученные значения подтверждаются литературными источниками [11, 12]. Так, по мнению Sillanaukee P. и соавторов, количество свободных сиаловых кислот в моче у здорового человека составляет 50% от его общего уровня в сыворотке [9]. Полученное нами значение превышает эти показатели, поскольку мы определяли общее содержание сиаловых кислот, которое включает не только свободные, но и связанные сиаловые кислоты.

Таблица 1 - Концентрация сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина в биологических жидкостях.

Группа	Концентрация сиаловых кислот, мг/л		Концентрация α -1 кислого гликопротеина, мг/л	
	кровь	моча	кровь	моча
Здоровые волонтеры, n=25	$637,48 \pm 123,7$	$575,25 \pm 98,22$	$842,72 \pm 76$	340 ± 51
Эритремия, n=25	$912,53 \pm 146,7^*$	$1163,27 \pm 159,8^{**}$	$618,81 \pm 71^*$	$265 \pm 81^*$
Сублейкемический миелоз, n=24	$903,84 \pm 134,6^*$	$1004,72 \pm 153,3^{**}$	$882,37 \pm 47$	320 ± 34

*- вероятная разница между выборками по сравнению с нормой при $p < 0,05$, ** - $p < 0,001$.

В группах больных миелопролиферативными заболеваниями уровень сиаловых кислот отличался от значений, полученных в группе здоровых волонтеров, но между патологическими группами значительной разницы не обнаружено (табл. 1). Так, сывороточный уровень сиаловых кислот возрастал на $42,6 \pm 0,3\%$ ($p < 0,05$) и $41,5 \pm 0,6\%$ ($p < 0,05$), при эритремии и сублейкемическом миелозе, соответственно. Концентрация сиаловых кислот в моче была почти в 2 раза ($p < 0,001$) выше в обеих группах по сравнению с нормой. По литературным данным, содержание сиаловых кислот в сыворотке увеличивается при многих воспалительных процессах [8]. Так, недавние исследования показали, что смертность от сердечно-сосудистых заболеваний выше у населения с высоким содержанием сиаловых кислот [7]. Что касается онкозаболеваний, по мнению Chen S. и соавторов, увеличение уровня сиаловых кислот в крови при раке легких положительно коррелирует со степенью метастазирования данной опухоли [4, 5].

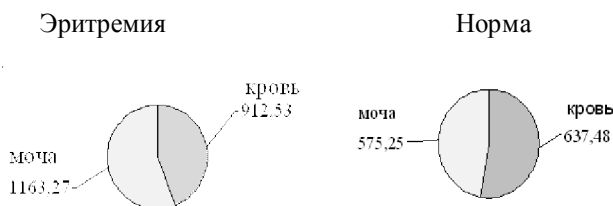


Рисунок 1 - Концентрация сиаловых кислот (мг/л) в биологических жидкостях

Важным диагностическим критерием является количество сиаловых кислот в крови и моче. Так, при неврологических заболеваниях их уровень значительно снижается в моче [10], а при почечных заболеваниях наблюдается тенденция к увеличению уровня сиаловых кислот и в моче, и в сыворотке крови [14]. Нами были получены заслуживающие внимания данные при сравнении концентрации сиаловых кислот в биологических жидкостях для каждой из исследуемых групп (рис. 1) (группа суб-

миелоза не представлена) Так, в норме процентное соотношение сиаловых кислот сыворотка крови/моча составляло 53/47, а при эритремии и сублейкемическом миелозе в среднем составило 44/56, что, возможно, связано с нарушением обмена веществ, в частности, с работой моче-половой системы при данных патологиях.

Исследования уровня α -1 кислого гликопротеина показали различия между двумя группами патологий: он снижался в сыворотке крови на $32,3 \pm 0,6\%$ и в моче на $31,4 \pm 0,5\%$ при эритремии и не отличался от нормы при сублейкемическом миелозе (см. табл. 1).

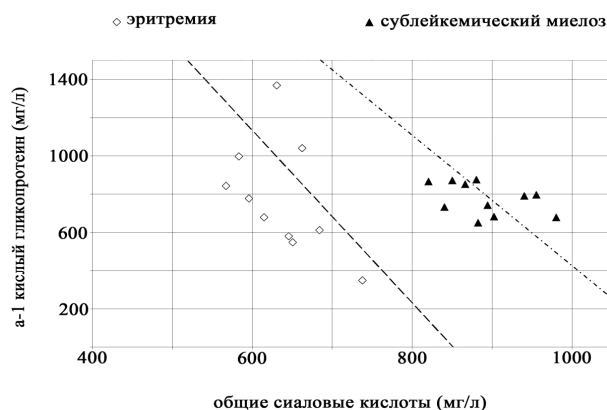


Рисунок 2 - Корреляции между уровнями общих сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина в сыворотке крови больных миелопролиферативными заболеваниями

Статистический анализ выявил отрицательную коррелятивную связь между уровнями сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина при эритремии $r = 0.68$, $p < 0,05$, а при сублейкемическом миелозе $r = 0.72$, $p < 0,05$ (рис. 2). В норме эти показатели коррелятивно связаны не были. Подобные закономерности были выведены Uslu и соавторами при исследовании больных с раком гортани. Они показали положительную корреляционную связь между уровнями связанных сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина на разных стадиях развития опухоли [10].

Выводы

1. Содержание общих сиаловых кислот в сыворотке крови при эритремии и сублейкемическом миелозе незначительно отличается при данных патологиях и достоверно возрастает по сравнению с нормой.
2. Концентрация общих сиаловых кислот в моче при миелопролиферативных заболеваниях в 2 раза превышает значения, полученные в норме.
3. Показана отрицательная корреляционная связь между концентрацией сиаловых кислот и α -1 кислого гликопротеина при миелопролиферативных заболеваниях, которая отсутствует в норме.
4. Уровень α -1 кислого гликопротеина снижен как в сыворотке крови, так и в моче больных эритремией, но находится в пределах нормы при сублейкемическом миелозе и может быть использован для дифференцировки данных заболеваний.

Заключение

Сиаловые кислоты принимают значительное участие в метаболических процессах при канцерогенезе, поэтому определение их содержания в биологических жидкостях имеет важный диагностический и прогностический критерий при онкопатологиях. Нами впервые показано

изменение уровня общих сиаловых кислот при эритромии и сублейкемическом миелозе как в сыворотке, так и в моче. Поскольку определенная группа исследователей указывает на низкую диагностическую ценность показателя уровня сиаловых кислот в связи с тем, что он связан с уровнем острофазовых белков, концентрация которых возрастает при любом патологическом процессе [7], нами были проведены исследования одновременно двух параметров: уровня общих сиаловых кислот и α -1-кислого гликопротеина. Полученные данные позволяют утверждать, что уровень сиаловых кислот как при эритромии, так и при сублейкемическом миелозе возрастает в среднем на 42%, а содержание α -1-кислого гликопротеина при этом уменьшается в среднем на 31% (см.табл.1). Причем, если в норме корреляция между этими показателями отсутствовала, то при миелопролиферативных процессах они были достоверно связаны (см.рис.2), что, возможно, свидетельствует о закономерностях протекания онкопатологии и подтверждается работами других авторов [6]. поскольку увеличение содержания сиаловых кислот связано с изменением сиалированности гликопротеинов [1]. Поэтому важным является изучение сиалоформ α -1-кислого гликопротеина, которое ляжет в основу дальнейшего нашего исследования.

Литература

1. Angata, T. Chemical diversity in the sialic acids and related keto acids: an evolutionary perspective. / T.Angata, A.Varki // Chem.Rev. - 2002. - №102. - P. 439 - 469.
2. Bhagava, N.V. Heteropolysaccharides: Glycoproteins and glycolipids. / N.V Bhagava // Medical Biochemistry. Elsevier publisher. - 2002. - №4.-P. 153 - 171.
3. Ceciliani, F. The acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases/ F.Ceciliani, V.Pocacqua // Curr Protein Pept Sci. - 2007. - № 8 Feb.- P. 91-108.
4. Chen, S. Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis. / S.Chen, M.Fukuda. // Methods Enzymol. - 2006. - №416.-

P. 371-380.

5. Kim, YJ, Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. / YJ. Kim, A.Varki. // Glycoconj. - 1997. - №14.- P. 569-576.
6. Nakano M. Detailed structural features of glycan chains derived from α -1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. / Miyako Nakano, Kazuaki Kakehi, Men-Hwei Tsai, Yuan C. Lee. / Oxford University Press. - 2004. - №5.- P. 431-441.
7. Parkash, A. Study of serum total sialic acid level and its correlation with atherogenic index in cases of acute myocardial infarction. / A. Parkash, P.Singla, M.Seth, H.K.Agarwal // International Journal of Pharma and Bio Sciences. - Jun 2011. - № 2 - P. 8-14
8. 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.
9. Sillanaukee, P. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. / P.Sillanaukee, M.Ponno, I.P Jaaskelainen / Eur J Clin Invest.- 1999. - № 5. - P. 413-425.
10. Uslu, C. Serum free and bound sialic acid and alpha-1-acid glycoprotein in patients with laryngeal cancer. / C. Uslu., S.Taysi., F.Akay et al. // Ann Clin Lab Sci. - 2003.- №2.- P. 156-159.
11. Varki, A Glycan-based interactions involving vertebrate sialic acid-recognizing proteins. /A.Varki // Nature. - 2007. - № 446.- P. 1023 - 1029.
12. Varki, A. Sialic acids in human health and disease. / A.Varki / Cell press. - 2008.- № July. - P. 351-359.
13. Vedralova, E. Evaluation of serum sialic acid fractions as markers for malignant melanoma. / E.Vedralova, J.Borovansky // Annals of Clinical and Laboratory Science.- 2003.- №33.- P. 156-159.
14. Wan P.H. Altered Glycosylation in Cancer: Sialic Acids and Sialyltransferases / Wang P.H. // Journal of Cancer Molecules. - 2005. - №2. P.73-81.
15. Waters, P.J. Measurement of sialic acid in serum and urine: clinical applications and limitations. Department of Chemical Pathology. / P.J Waters, / E.Lewry, C.A. Pennock. // St Michaels Hospital, Bistol, UK.- 1992.- №29. P.6

THE CONTENT OF α -1 ACID GLYCOPROTEIN AND SIALIC ACIDS IN BIOLOGICAL FLUIDS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE DISEASE

A.S. Maslak, O.V. Kostyuk, I.V. Mashejko, A.Z. Brazaluk

State Institution "Dnepropetrovsk Medical Academy", Dnepropetrovsk, Ukraine

The aim of the study was to investigate the concentration of total sialic acids and α -1 acid glycoprotein in the blood and urine in patients with erythremia and subleukemic myelosis. The content of α -1 acid glycoprotein in serum and urine were determined by immunodot assay, and the level of sialic acids - with "SialoTest" (Scientific production center "Eco-Service", Russia). The study showed an increased serum levels of sialic acids by $42.6 \pm 0.3\%$ ($p < 0.05$) and $41.5 \pm 0.6\%$ ($p < 0.05$) in erythremia and subleukemic myelosis respectively. The concentration of sialic acid in the urine increased by almost 2-fold ($p < 0.001$). The level of α -1 acid glycoprotein in erythremia reduced by $32.3 \pm 0.6\%$ and $31.4 \pm 0.5\%$ ($p < 0.05$) in serum and urine, respectively, and did not differ from the norm in subleukemic myelosis. The data obtained can be used for early detection and differential diagnosis of the group of myeloproliferative disorders.

Key words: α -1 acid glycoprotein, sialic acids, erythremia, subleukemic myelosis.

Адрес для корреспонденции: e-mail: maslak_anna@mail.ru

Поступила 22.01.2013