

УДК 577.112.85:616.4:616.155.392-036.1:615.277

## СТЕПЕНЬ РАЗВЕТВЛЕННОСТИ N-ГЛИКАНОВ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЛЕЧЕНИЯ

Маслак А.С.

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины», Днепропетровск, Украина

*Целью работы было исследование степени разветвленности гликанов б1-кислого гликопротеина (АГП) и фибронектина (ФН) в плазме пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) до лечения и после прохождения ЦОП-терапии. Степень гликозильованности ФН и АГП изучали методом лектин-ферментного анализа с использованием лектинов Con A и РНА-L. Показано снижение количества гликоформ АГП и ФН с биантенными и повышение содержания трех- и тетра-антенных N-гликанов в плазме пациентов с ХЛЛ. Под действием ЦОП-терапии относительное содержание биантенных N-гликанов ФН возрастало, а у АГП – не отличалось от нормы, что свидетельствует о влиянии полихимиотерапии на гликобиохимические процессы.*

**Ключевые слова:** б-1 кислый гликопротеин, фибронектин, N-гликаны, хронический лимфолейкоз.

### Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – это опухолевое заболевание лимфатической ткани, которое возникает вследствие мутации клетки-предшественника лимфоцита. ЦОП-терапия является одной из стандартных, эффективных и часто используемых схем лечения ХЛЛ в Украине [1]. Следует, однако, отметить, что в литературе практически отсутствуют исследования влияния ЦОП-терапии на плазменные формы гликопротеинов, которые вовлечены в процессы малигнизации [10].

Одними из самых известных белков плазмы, которые отличаются высокой степенью микрогетерогенности, являются б1-кислый гликопротеин (АГП) и фибронектин (ФН). Плазменный б1-кислый гликопротеин (40кДа) является висогликозилированным белком с пятью би, трех- и тетраантенными N-гликанами комплексного типа, которые значительно влияют на его иммуномодулирующие функции в условиях развития опухоли. Он отличается высокой степенью микрогетерогенности (существует 10<sup>6</sup> гликоформ АГП) и предложен в качестве прогностического и диагностического маркера многих воспалительных и онкопролиферативных процессов [7]. ФН относят к высокомолекулярным (440кДа) мультидоменным гликопротеинам с N- и O-олигосахаридными цепями, локализованными в клетка- и коллаген-связывающих доменах, гликаны которого играют важную роль в основных биологических процессах: адгезии и миграции клеток. Плазменная форма ФН содержит биантенные олигосахаридные цепи комплексного типа и триантенные структуры N-гликанов [13], а их перераспределение, а также изменение степени сиалирированности или фукозилированности значительно влияют на биологическую активность в условиях опухолевых процессов. Так, по данным Jankovic M. др. гликоформы ФН с различным содержанием биантенных N-гликанов, выделенные у пациентов с протатической гиперплазией и опухолью простаты, имеют разную адгезивную функцию по отношению к фибробластам таких пациентов и изменяются на фоне лечения [9]. Исходя из вышперечисленного, исследования микрогетерогенности плазменных гликопротеинов могут помочь в понимании процессов, происходящих в организме онкобольных пациентов во время химиотерапевтического лечения. Целью работы было исследование степени разветвленности гликанов б1-кислого гликопротеина и фибронектина в плазме пациентов с ХЛЛ до лечения и после прохождения ЦОП-терапии.

### Материалы и методы

Материалом исследования служила плазма крови пациентов с ХЛЛ (n = 20) в возрасте 58-66 лет, которые в зависимости от срока лечения составили три группы: I – до лечения, II – в первые сутки с начала проведения курса стандартной полихимиотерапии по схеме ЦОП (циклофосфамид 750 мг/м<sup>2</sup> в/в в 1-й день, винкристин (онковин) 1,4 мг/м<sup>2</sup> в/в в 1-й день, преднизолон в дозе 40 мг/м<sup>2</sup> в течение 5 дней), III – через два месяца после проведения первого курса стандартной химиотерапии по схеме ЦОП. В группу контроля вошли гематологически здоровые волонтеры (n = 20) в возрасте от 55 до 65 лет. Отбор биологического материала для исследований выполнялся согласно принципам биоэтики и медицинской деонтологии. Все обследуемые давали письменное согласие на участие в исследовании.

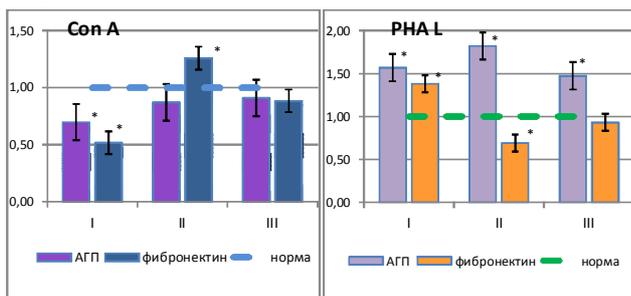
Степень гликозильованности ФН и АГП изучали методом лектин-ферментного анализа [2,3] с использованием антител к ФН и АГП плазмы, которые были дегликозилированы с помощью N-Glycosidase F (US Biological, США). Отсутствие углеводов в составе дегликозилированных иммуноглобулинов, их аффинность и специфичность проверяли лектин- и иммунодот анализами. Использовали лектин канавалии мечевидной - Con A (Лектинотест, Украина), фитогемаглютинин L - РНА-L (Лектинотест, Украина). Для контроля специфичности связывания лектинов с углеводными детерминантами ФН и АГП в реакционную смесь добавляли соответствующие моносахариды-ингибиторы в концентрации 0,1 моль/л. Лектин-связывающую активность оценивали как процент связывания соответствующего лектина с ФН и АГП плазмы относительно нормы в пересчете на 1 мкг каждого белка. Концентрацию ФН и АГП в плазме определяли методом иммунодота с использованием поликлональных кроличьих антител к ФН и АГП, соответственно. Полученные результаты вычисляли с помощью программ GelProAnalyser 3.1. Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ Statistics 6.0. Достоверность различий в исследуемых группах устанавливали по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Для исследования структуры гликанов ФН и АГП плазмы нами были выбраны лектины с противоположной специфичностью: ConA, реагирующий с коровой маннозой биантенных гликанов и РНА-L, имеющий сродство к трех- и тетра-антенным N-гликанам, и не взаимодей-

ствующий с биантенными углеводными детерминантами [8].

В результате проведенных исследований нами было показано, что степень связывания с лектином ConA как АГП, так и ФН достоверно ( $p < 0,05$ ) снижалась по сравнению с нормой на  $31 \pm 2,1\%$  и  $48 \pm 3,5\%$ , соответственно, в плазме у пациентов с ХЛЛ. В то время как связывание обоих гликопротеинов с РНА-Л у таких пациентов, наоборот, возрастало: на  $57 \pm 4,5\%$  для АГП и на  $38 \pm 3,2\%$  для фибронектина (рис. 1). Статистическая обработка результатов показала, что между ConA- и РНА-Л-связывающей активностью АГП и фибронектина существуют негативные корреляционные связи, а коэффициент Пирсона равен, соответственно,  $r = -0,38$ ,  $p < 0,05$  и  $r = -0,36$ ,  $p < 0,05$ .

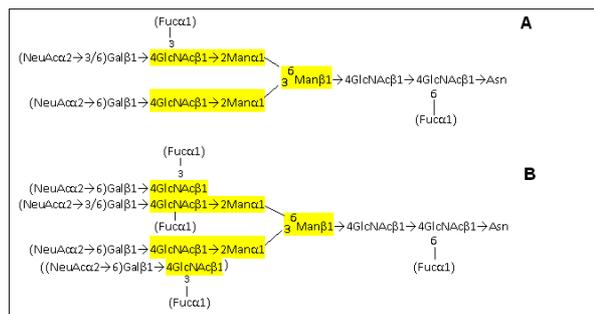


**Рисунок 1 - Связывание (в %) б1-кислого гликопротеина и фибронектина с ConA и РНА-Л относительно нормы (штрихованная линия) в трех исследуемых группах: I - до лечения, II - первые сутки с начала проведения курса стандартной полихимиотерапии по схеме ЦОП; III - через два месяца после проведения первого курса стандартной химиотерапии по схеме ЦОП**

Таким образом, в условиях ХЛЛ изменяется распределение гликоформ АГП и ФН по степени разветвленности их гликанов, а именно повышается содержание трех- и тетра-антенных углеводных ветвей в их составе. Изменения такого типа относят к основному типу микрогетерогенности и зависят только от экспрессии и активности энзимов посттрансляционной модификации – глюкозаминотрансфераз. Снижение экспрессии N-ацетилглюкозаминотрансферазы III, отвечающей за синтез биантенных N-гликанов и повышение экспрессии N-ацетилглюкозаминотрансферазы V, участвующей в синтезе полиантенных ветвей, показано Yoshimura и соавторами у пациентов с лейкозами в хронической фазе по сравнению с группой пациентов с лейкозами в стадии бластного криза [16]. Возможно, такое нарушение экспрессии перечисленных гликозилтрансфераз может быть причиной изменений в разветвленности углеводных последовательностей АГП и фибронектина у пациентов с диагнозом ХЛЛ.

После проведения ЦОП-терапии ConA-связывающая активность АГП находилась в пределах нормы, то есть, относительное содержание биантенных N-гликанов нормализовалось под действием ЦОП-терапии и оставалось неизменным через два месяца после ее проведения (см. рис. 1). Однако, по сравнению с группой контроля, содержание плазменных гликоформ АГП с полиантенными гликанами в группах II и III было повышенным.

Такое аднормальное перераспределение АГП можно объяснить сложным механизмом ответа организма на противоопухолевую терапию, в котором непосредственное участие принимает АГП в качестве связывающего



**Рисунок 2 - Структуры биантенных (А) и полиантенных (В) N-гликанов б1-кислого гликопротеина и фибронектина [7,13].**

Цветом выделены сайты взаимодействия Con A (А) и РНА L (В) [8]

щего лекарства агента. Наибольший интерес заслуживают известные данные по связыванию винкристина с сайтами АГП [14]. Так, по данным Tesseromatis, активность взаимодействия АГП напрямую зависит от состояния углеводородных ветвей, и в большей степени от разветвленности его N-гликанов [4]. Хотя сайты АГП, взаимодействующие с лекарствами, имеют пептидное происхождение, изменения углеводных ветвей значительно влияют на конформацию и укладку гликопротеина, а значит и на его функциональную активность. Так, по данным Jennifer L. Behan, распределение плазменных гликоформ АГП изменяется под влиянием метадона. Известно также, что гликоформы этого белка с полиантенными слабо сialiрированными N-гликанами взаимодействуют с данным лекарством [6]. Возможно, подобные процессы происходят под влиянием ЦОП-терапии, в результате чего в плазме повышается уровень гликоформ АГП с разветвленными N-гликанами.

В плазме пациентов с ХЛЛ в первые сутки после проведения химиотерапии определялось достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение количества гликоформ фибронектина с биантенными N-гликанами на  $26 \pm 2,2\%$  и снижение количества гликоформ с трех- и тетра-антенными гликанами на  $32 \pm 3,0\%$  (рис. 1). А коэффициент корреляции Пирсона показал существование почти функциональной связи между этими параметрами и составил 0.91. Таким образом, распределение гликоформ ФН отличалось от распределения АГП в группе II. Поскольку известно, что преднизолоновая терапия влияет на уровень ФН [12], его свойства и конформацию [11], то можно предположить, что в условиях ЦОП-терапии может наблюдаться активация его синтеза клетками негепатоцитарного происхождения, например лимфоцитами и  $CD19^+$ -клетками [5], что приводит к появлению микрогетерогенного фибронектинового пула. Следует отметить, что через два месяца после прохождения ЦОП-терапии распределение гликоформ ФН не отличалось от распределения у гематологически здоровых доноров.

### Выводы

1. У пациентов с хроническим лимфолейкозом изменяется распределение гликоформ АГП и фибронектина по степени разветвленности их N-гликанов: снижается количество гликоформ с биантенными ветвями и повышается содержание трех- и тетра-антенных углеводных последовательностей.

2. Относительное содержание биантенных N-гликанов АГП нормализовалось под действием ЦОП-терапии в первые сутки лечения и через два месяца, в то время как содержание плазменных гликоформ АГП с полиантен-

ными гликанами по сравнению с группой контроля было повышенным.

3. В плазме пациентов с ХЛЛ в первые сутки после проведения химиотерапии определялось повышение количества гликоформ фибронектина с биантенными и снижение количества гликоформ с полиантенными N-гликанами, а через два месяца после лечения это соотношение не отличалось от нормы.

### Заклучение

Исследования влияния противоопухолевой терапии на гликобиохимические процессы в организме онкобольных в последнее время приобретают большое значение, поскольку изменения гликотопов растворимых или клеточных гликоконъюгатов значительно влияют на течение опухолевого процесса. Многие эксперименты, связанные с коррективной обработкой процессов гликозилирования (фукозилирования, сиалирования) показали эффективность использования таких подходов для лечения онкобольных [15]. Полученные в работе данные свидетельствуют о возможном влиянии ЦОП-терапии на процессы гликози-

лирования, за которые отвечают энзимы, локализованные в аппарате Гольджи и отвечающие за разветвленность N-гликанов белков. В работе исследованы два различных по молекулярной массе, содержанию в плазме высокомикроретерогенных белка АГП и фибронектин. Несмотря на это, корреляционный анализ показал взаимосвязь между изменениями гликозилированности этих белков, что может свидетельствовать об универсальности процессов гликозилирования, происходящих под действием химиотерапии.

Нормализация распределения гликоформ фибронектина через два месяца после проведения ЦОП-терапии у пациентов ХЛЛ может выступать прогностическим маркером, но требует дополнительных клинических исследований. Исходя из функциональных особенностей АГП в направлении связывания с лекарствами и роли в этих процессах его углеводной части, можно предположить, что перераспределение его гликоформ по разветвленности связано именно с этой его функцией. Дальнейшие исследования данных параметров одновременно с клиническими показателями у таких пациентов может показать существование этой связи и доказать прогностическую ценность полученных результатов.

### Литература

1. Лаповеці, Л.С. Вибрані лекції з лабораторної медицини. Частина I. Гематологічні дослідження / Л.С.Лаповеці, Г.Б.Лебедь, О.О.Ястремська // Львів. - 2013. - С. 192-193.
2. Пат. на корисну модель № 54113 Україна, МПК А61В 5/145. Спосіб визначення ступеню фукозилюваності фібронектину / Кулініч А.О., Шевцова А.І., Письменецька І.Ю., Маслак Г.С. (Україна); Дніпропетровська державна медична академія. - заявл. 05.05.2010; опубл. 25.10.2010, Бул. №20.
3. Пат. №53176 Україна, МПК7(2009) А61В 5/145. Спосіб визначення ступеню сIALюваності альфа-1-кислого глікопротеїну / Стекленьова Н.І., Шевцова А.І., Бразалук О.З., Машейко І.В. (Україна); Дніпропетровська державна медична академія. - заявл. 02.04.2010; опубл. 27.09.2010, Бул. №18.
4. Acute phase proteins – regulation and functions of acute phase proteins // Hard Cover: editor by F. Veas.- Rijeka.- Slovakia: InTech Europe, 2011.- 368 p.
5. Anders, O. Plasma fibronectin in acute leukemia. Effects of the cytostatic therapy on plasma fibronectin level / O. Anders, M. Backhaus, F. Mielke et al. // Folia Haemat Int Mag Klin Morphol Blutforsch. - 1987. - Vol.114. № 3. - P. 348-358.
6. Behan, J.L. The glycosylation of AGP and its associations with the binding to methadone / J.L. Behan, Y.E. Cruickshank, G. Matthews-Smith et al. // BioMed ResIntern. - 2013. - Vol.13. P. 108-115.
7. Ceciliani, F. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases / F. Ceciliani, V. Pocacqua // Curr. Protein Pept. Sci. - 2007. - Vol.8.- № 1. - P. 91-108.
8. Debray, H. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins / H. Debray, D. Decout, G. Strecker et al. // Eur J Biochem. - 1981. - Vol. 117. - № 1. - P.41-55.
9. Jankovic, M.M. Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate / M.M. Jankovic, M.M. Kosanovic // Dis. Markers. - 2008. - Vol. 25. - № 1. - P.49-58.
10. Hashimoto T. 61-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis / T.Hashimoto, S.Asao, T.Takahashi // Cancer. - 2004.-Vol. 101. № 282. - P.528-536.
11. Millard, C.J. Gelatin binding to the 8F19F1 module pair of human fibronectin requires site-specific N-glycosylation / C.J. Millard, I.D. Campbell, R.A. Pickford // FEBS Let. - 2005. - Vol. 579. № 20. - P.4529-4534.
12. Nishino, H. Decreases in plasma antithrombin III, fibrinogen, factor IX, X and XI, fibronectin and thyroxine binding globulin during

### Literature

1. Lapoveci, L.C. Vibriani lekciї z laboratornoї medicini. CHastina I. Gematologichni doslidzhennja/ L.C.Lapoveci, G.B.Lebed', O.O.Jastrems'ka // L'viv. - 2013. - S. 192-193.
2. Pat. na korisnu model' № 54113 Ukraїna, MPK A61V 5/145. Sposib viznachennja stupenyu fukoziľovanosti fibronektinu / Kulinich A.O., SHEvcova A.I., Pis'menec'ka I.Y.U., Maslak G.S. (Ukraїna); Dnipropetrovs'ka derzhavna medichna akademija. - zajavl. 05.05.2010; opubl. 25.10.2010, Byul. №20.
3. Pat. №53176 Ukraїna, MPK7(2009) A61B 5/145. Sposib viznachennja stupenyu sial'ovanosti al'fa-1-kislogo glikoproteїnu / Steklen'ova N.I., SHEvcova A.I., Brazaluk O.Z., Masheiko I.V. (Ukraїna); Dnipropetrovs'ka derzhavna medichna akademija. - zajavl. 02.04.2010; opubl. 27.09.2010, Byul. №18.
4. Acute phase proteins – regulation and functions of acute phase proteins // Hard Cover: editor by F. Veas.- Rijeka.- Slovakia: InTech Europe, 2011.- 368 p.
5. Anders, O. Plasma fibronectin in acute leukemia. Effects of the cytostatic therapy on plasma fibronectin level / O. Anders, M. Backhaus, F. Mielke et al. // Folia Haemat Int Mag Klin Morphol Blutforsch. - 1987. - Vol.114. № 3. - P. 348-358.
6. Behan, J.L. The glycosylation of AGP and its associations with the binding to methadone / J.L. Behan, Y.E. Cruickshank, G. Matthews-Smith et al. // BioMed ResIntern. - 2013. - Vol.13. P. 108-115.
7. Ceciliani, F. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases / F. Ceciliani, V. Pocacqua // Curr. Protein Pept. Sci. - 2007. - Vol.8.- № 1. - P. 91-108.
8. Debray, H. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins / H. Debray, D. Decout, G. Strecker et al. // Eur J Biochem. - 1981. - Vol. 117. - № 1. - P.41-55.
9. Jankovic, M.M. Fibronectin pattern in benign hyperplasia and cancer of the prostate / M.M. Jankovic, M.M. Kosanovic // Dis. Markers. - 2008. - Vol. 25. - № 1. - P.49-58.
10. Hashimoto T. 61-acid glycoprotein fucosylation as a marker of carcinoma progression and prognosis / T.Hashimoto, S.Asao, T.Takahashi // Cancer. - 2004.-Vol. 101. № 282. - P.528-536.
11. Millard, C.J. Gelatin binding to the 8F19F1 module pair of human fibronectin requires site-specific N-glycosylation / C.J. Millard, I.D. Campbell, R.A. Pickford // FEBS Let. - 2005. - Vol. 579. № 20. - P.4529-4534.
12. Nishino, H. Decreases in plasma antithrombin III, fibrinogen, factor IX, X and XI, fibronectin and thyroxine binding globulin during

therapy with L-asparaginase, vincristine and prednisolone in a patient with CML blastic crisis / H. Nishino, S. Miura, Y. Hirai // Rinsho Ketsueki. – 1984.- Vol. 25.- №6. – P.882-887.

13. Tajiri, M. Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach / M.Tajiri, C. Ohyama, Y. Wada // Glycobiology. - 2008. - Vol. 18. - № 1.-P.2-8.

14. Woodcock, B.G. Effect of D,L-verapamil, verapamil enantiomers and verapamil metabolites on the binding of vincristine to alpha 1-acid glycoprotein / B.G. Woodcock, M.S. Abdel-Rahman, F. Wosch et al. // Eur J Cancer. - 1993.- Vol. 29.- №4.- P.559-561.

15. Yoshida, M. Targeting Anticancer Drug Delivery to Pancreatic Cancer Cells Using a Fucose-Bound Nanoparticle Approach / M. Yoshida, R. Takimoto, K. Murase // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. - № 7. – P. 395-455.

16. Yoshimura, M. High expression of udp-n-acetylglucosamine: b-d mannoside b-1, 4-n-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) in chronic myelogenous leukemia in blast crisis / M. Yoshimura, A. Nishikawa, Y. Ihara // Intern. J of Can. – 1995.-Vol. 60.- № 4. – P.443–449.

therapy with L-asparaginase, vincristine and prednisolone in a patient with CML blastic crisis / H. Nishino, S. Miura, Y. Hirai // Rinsho Ketsueki. – 1984.- Vol. 25.- №6. – P.882-887.

13. Tajiri, M. Oligosaccharide profiles of the prostate specific antigen in free and complexed forms from the prostate cancer patient serum and in seminal plasma: a glycopeptide approach / M.Tajiri, C. Ohyama, Y. Wada // Glycobiology. - 2008. - Vol. 18. - № 1.-P.2-8.

14. Woodcock, B.G. Effect of D,L-verapamil, verapamil enantiomers and verapamil metabolites on the binding of vincristine to alpha 1-acid glycoprotein / B.G. Woodcock, M.S. Abdel-Rahman, F. Wosch et al. // Eur J Cancer. - 1993.- Vol. 29.- №4.- P.559-561.

15. Yoshida, M. Targeting Anticancer Drug Delivery to Pancreatic Cancer Cells Using a Fucose-Bound Nanoparticle Approach / M. Yoshida, R. Takimoto, K. Murase // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. - № 7. – P. 395-455.

16. Yoshimura, M. High expression of udp-n-acetylglucosamine: b-d mannoside b-1, 4-n-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) in chronic myelogenous leukemia in blast crisis / M. Yoshimura, A. Nishikawa, Y. Ihara // Intern. J of Can. – 1995.-Vol. 60.- № 4. – P.443–449.

## DEGREE OF BRANCHING OF N-GLYCANS OF PLASMA PROTEINS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AT DIFFERENT STAGES OF TREATMENT

*Maslak A.S.*

State Institution “Dnepropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine”,  
Dnepropetrovsk, Ukraine

*The aim of the study was to investigate the degree of branching of N-glycans of plasma b1-acid glycoprotein (AGP) and fibronectin (FN) in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) before the treatment and after the COP-therapy. Glycosylation degree was studied by the enzyme linked lectin assay with two lectins: Con A and PHA-L. The reduction in the number of AGP and FN glycoforms with biantennary carbohydrates and increase of the level of polyantennary glycoforms of these proteins in plasma of patients with CLL was shown. The relative content of biantennary N-glycans was increased in FN and was in norm in AGP after using of the COP-therapy. It showed the effect of chemotherapy on glycobiochemical processes.*

**Key words:** *b-1 acid glycoprotein, fibronectin, N-glycans, chronic lymphocytic leukemia/*

Адрес для корреспонденции: e-mail: maslak\_anna@mail.ru

Поступила 04.10.2013