

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ»**

НЕТРОНІНА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 577.112.85:616.008.8-074

**СІАЛОВІ КИСЛОТИ ПЛАЗМИ ТА СІАЛЬОВАНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ
ПРИ ХРОНІЧНИХ ЛІМФО- І МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ
ЗАХВОРЮВАННЯХ КРОВІ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Тернопіль – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бразалук Олександр Захарович,
ДЗ «Дніпропетровська медична академія
МОЗ України», професор кафедри біохімії, медичної
та фармацевтичної хімії.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Ушакова Галина Олександрівна,
Дніпропетровський національний університет
імені О. Гончара МОН України,
завідувач кафедри біофізики та біохімії.
доктор медичних наук, професор
Олещук Олександра Михайлівна,
ДВНЗ «Тернопільський державний медичний
університет імені І.Я. Горбачевського
МОЗ України»,
завідувач кафедри фармакології з клінічною
фармакологією.

Захист дисертації відбудеться «1» липня 2016 р. о 12⁰⁰ год на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 у ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1.

Із дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розіслано «28» травня 2016 р.

**Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, доцент**

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Глікопротеїни – це група складних сполук, які містять у своєму складі олігосахаридні ланцюги, ковалентно зв'язані з білковою основою. До таких сполук належить більша частина білків плазми крові, а також деякі білки зовнішньої сторони клітинної мембрани (Gamblin D.P. et al., 2009). Склад та кількість олігосахаридних ланцюгів впливає на конформацію білкової частини глікопротеїнів та визначає їх антигенну специфічність. Одним з найбільш важливих компонентів глікопротеїнів є сіалові кислоти – N-ацетилнейрамінова кислота та її похідні (Schauer R., 1988; Ghaderi D. et al., 2012; Kim C-H., 2014). Ці кислоти займають термінальне положення вуглеводних ланцюгів, надаючи молекулі гідрофільних властивостей та негативного заряду (Ressa D.K. et al., 2004). У плазмі крові велика кількість сіалових кислот присутня в складі фібриногену, гаптоглобіну, церулоплазміну, α 1кислого глікопротеїну, трансферину (Nigam P.K. et al., 2006). Сіалокон'югати присутні також на поверхні клітин (Traving P., Schauer R., 1998). Сіалові кислоти виконують ряд біологічних функцій, які включають у себе зв'язування і транспорт позитивно заряджених молекул, беруть участь у міжмолекулярній взаємодії між клітинами і молекулами, вони також діють як захисний екран для термінальної частини молекули або клітин (Schauer R., 2004; Shehu S.A. et al., 2006).

При неопластичній трансформації клітин крові порушується їх диференціювання, змінюються функції та міжклітинна взаємодія (Тюрєв И.И., 2008). У цих процесах важливу роль відіграють саме глікопротеїни. Відомо, що при різних видах лейкозів змінюються рівень та структура плазмових та поверхневих глікопротеїнів клітин крові (Brown V.A. et al., 1985; Stromskaya T.P. et al., 2008; Al-Dewik N.I. et al., 2015). На сьогодні кількісний та якісний склад глікопротеїнів сироватки крові у хворих з пухлинами кровотворної системи недостатньо вивчено, що зумовлює необхідність дослідження показників обміну глікопротеїнів в онкогематології.

З метою верифікації діагнозу в більшості пацієнтів із хронічними лімфо- та мієлопроліферативними захворюваннями не завжди існує можливість провести сучасне цитогенетичне або молекулярно-генетичне дослідження кісткового мозку та крові. Тому необхідними є пошук додаткових діагностичних критеріїв диференційної діагностики та визначення фази перебігу онкопатологій.

Лейкозна трансформація супроводжується змінами експресії або втратою тих чи інших глікопротеїнів (Young J.K., 1997; Reis C.A. et al., 2010). Тому доступні методи дослідження показників обміну глікопротеїнів лейкоцитів можуть бути використані в лабораторній діагностиці лейкозів.

Дані літератури свідчать про те, що біохімічний фенотип лейкозних клітин, важливою складовою якого є вуглеводовмісні сполуки, відображає процеси неопластичної трансформації, але механізм канцерогенезу є недостатньо вивченим і роль вуглеводної детермінанти у складі

глікопротеїнів при онкотрансформації та метастазуванні залишається не повністю з'ясованою. У зв'язку з цим, можна вважати обґрунтованими дослідження сіалоглікопротеїнів в організмі хворих із пухлинами кровотворної тканини та визначення можливості їх використання як маркера пухлинного процесу й ефективності застосування протипухлинних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії, медичної та фармацевтичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри за темою «Посттрансляційні зміни (модифікації) білків за умов патологічних процесів» (№ держреєстрації 0114U001279).

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було встановлення вмісту вільних і зв'язаних форм сіалових кислот, кількісних та якісних змін сіальованості клітинних і плазмових глікопротеїнів при онкопроліферативних захворюваннях крові. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Провести порівняльний аналіз кількості загальних, вільних та зв'язаних сіалових кислот у плазмі крові пацієнтів із лімфо- і мієлопроліферативними хворобами та гематологічно здорових донорів.
2. Визначити ступінь сіальованості глікопротеїнів плазматичних мембран лімфоцитів у нормі та при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях крові.
3. Виявити розподіл сіальованих глікопротеїнів, що містять N- та O-глікани на клітинах крові в нормі й при патології.
4. Визначити активність сіалідаз у плазмі крові здорових донорів та при онкопроліферативних захворюваннях.
5. Дослідити розподіл клітин крові за кількістю термінальних залишків сіалових кислот у складі вуглеводної частини глікопротеїнів при гематоонкопатології.
6. Вивчити вплив цитотоксичної терапії на вміст сіалових кислот, активність сіалідаз, сіальованість глікопротеїнів плазматичних мембран лімфоцитів при В-хронічному лімфолейкозі.

Об'єкт дослідження: сіальованість лімфоцитів при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях.

Предмет дослідження: показники вмісту сіалових кислот, ступеня сіальованості та зміни вуглеводної частини глікопротеїнів лімфоцитів крові при гемато-онкологічних захворюваннях.

Методи дослідження: препаративної біохімії (одержання лімфоцитів, виділення мембран), аналітичної біохімії (спектрофотометрія, лектин-блот аналіз, електрофорез), молекулярно-біологічні (полімеразна ланцюгова реакція), протокової цитофлуориметрії, конфокальної мікроскопії, статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведено комплексне дослідження концентрації загальних, вільних та зв'язаних

сіалових кислот у плазмі, визначено розподіл сіалових кислот на клітинах крові, розподіл клітин крові за кількістю термінальних залишків сіалових кислот у вуглеводній частині глікопротеїнів. Уперше показано збільшення вмісту сіалових кислот на поверхні лімфоцитів при онкопроліферативних захворюваннях крові, що призводить до підвищення незв'язаних карбоксильних груп і, як наслідок, збільшення заряду мембран клітин, що може сприяти включенню їх у здорові тканини. Встановлено, що сіальованість мембран лімфоцитів крові хворих на В-хронічний лімфолейкоз змінюється на різних етапах лікування цитостатичними препаратами. Кількість лімфоцитів з α 2,6-сіальованими гліканами зростає вже на першу добу хіміотерапії і залишається незмінною до кінця курсу лікування. Щодо кількості лімфоцитів, які несуть на поверхні α 2,3- зв'язані сіалові кислоти, то вона знижується впродовж усього лікування.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані в роботі дані щодо кількісних та якісних змін поверхневих глікокон'югатів лімфоцитів при онкогематологічних захворюваннях є важливими для з'ясування патогенезу онкологічних процесів. Закономірності зміни вуглеводного компонента глікокон'югатів плазматичних мембран лімфоцитів можуть слугувати додатковим критерієм діагностики лімфо- і мієлопроліферативних захворювань крові. Результати роботи впроваджено в науково-навчальний процес кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри біохімії та біофізики Дніпропетровського національного університету ім. Олесь Гончара при викладанні курсу «Біохімія патологічних процесів», кафедри медичної біохімії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України, кафедри онкології і медичної радіології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Вибір теми дисертаційної роботи, встановлення мети, завдань, обговорення результатів дослідження здійснено спільно з науковим керівником. Дисертантка самостійно провела патентний пошук і проаналізувала дані науково-дослідних робіт вітчизняних та зарубіжних вчених. Автор самостійно виконала всі експериментальні дослідження на базі кафедри біохімії, медичної та фармацевтичної хімії ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (свідоцтво про атестацію № 2031811 від 05.02.2012 р.) та в лабораторії оптичних методів дослідження Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Дисертантка розробила програму вирішення поставлених завдань, інтерпретувала отримані результати, сформулювала основні висновки, здійснила статистичну обробку даних та аналіз результатів, підготувала до друку основні матеріали за результатами дисертаційної роботи. Автор висловлює подяку кандидату біологічних наук, доценту кафедри біохімії,

медичної та фармацевтичної хімії Г.С. Маслак за проведення експериментальних досліджень та консультативну допомогу при обговоренні результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації було представлено на: VII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2011), X Міжнародній науковій конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна» (Київ, 2012), VII Львівсько-Люблінській конференції «Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії» (Львів, 2013), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (Дніпропетровськ, 2013), Другій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), XI Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015), Третій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 2015).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 15 наукових праць: 6 статей, із яких 4 – у наукових фахових виданнях України, 2 – у періодичних іноземних виданнях, 8 тез доповідей – у матеріалах вітчизняних та міжнародних наукових конгресів, конференцій та з'їздів, 1 деклараційний патент України на винахід.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена українською мовою на 158 сторінках друкованого тексту (основний обсяг становить 123 сторінки) і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел (294 найменування, з яких 129 – латиницею), 6 додатків. Робота містить 7 таблиць та проілюстрована 44 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі «**Огляд літератури**» описані сучасно дані щодо структури, властивостей та біологічної ролі сіалових кислот (СК), охарактеризовано й узагальнено уявлення про ферменти, відповідальних за вміст сіалових кислот у складі глікопротеїнів (нейрамінідази, сіалілтрансферази). Описано структуру лімфоцитів крові з точки зору наявності на їх поверхні сіалюваних глікокон'югатів. Приділено увагу змінам концентрації сіалових кислот, нейрамінідаз та сіалілтрансфераз, а також стану лімфоцитів при онкологічних захворюваннях.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом дослідження були плазма та лімфоцити хворих на мієло- та лімфолейкози віком від 48 до 66 років. Кількість пацієнтів з В-хронічним лімфолейкозом (В-ХЛЛ) становила 20 осіб, зі справжньою поліцитемією – 25 осіб та 24 хворих на сублейкемічний мієлоз. Групу контролю склали 25 гематологічно здорових донорів, якими

виступали співробітники академії, згідно з даними щорічної диспансеризації, яку проводять у клініці медичної академії. Усі пацієнти проходили лікування у спеціалізованому відділенні онкогематологічного центру КЗ «Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4» ДОР Дніпропетровська. Діагноз онкологічних захворювань крові був верифікований згідно із загальноприйнятими клінічними та морфологічними критеріями відповідно до наказу МОЗ України № 554 від 17.09.07 р. «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» із доповненням Наказом МОЗ України № 645 від 30.07.10 р.

Усі експерименти виконано з дотриманням норм Конвенції Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для досліджень та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2001) і наказу МОЗ України № 690 від 23.09.09 р. Комісія з питань біоетики ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» порушень морально-етичних норм при виконанні наукового дослідження не виявила (протокол № 3 від 24.02.16).

Для визначення концентрації загальних сіалових кислот у плазмі крові використовували «СіалоТест» (НВЦ Еко-Сервіс, Росія) згідно з інструкцією виробника. Виділення різних форм сіалових кислот здійснювали за допомогою ТХО (трихлороцтова кислота). При нагріванні глікопротеїнів плазми з трихлороцтовою кислотою проходить їх гідроліз з відщепленням оцтової та вільної сіалової кислоти. Для визначення сіалових кислот використовували кольорову реакцію з тіобарбітуровою кислотою (Шараев П.Н., 1993).

Активність нейрамінідази визначали за аглютинацією еритроцитів лектином арахісу (Nakano V., 2006). Як стандарт використовували нейрамінідазу з *Vibrio Cholerae* (Serva, Heidelberg, Germany).

Виділення лімфоцитів з гепаринізованої крові людини проводили у градієнті густини фікол-ураграфіну за модифікованим методом Woym A. (1968). Життєздатність клітин визначали за допомогою барвника трипанового синього, яка складала не менше 95 % від всіх лімфоцитів.

Для визначення загального білка в плазмі крові використовували метод Бредфорд (Bradford M.M., 1976; Ernst O., 2010).

Для розділення плазмових білків проводили диск-електрофорез у градієнті 5–17,5 % в поліакриламідному гелі згідно з модифікацією Леммі (Laemmli U.K., 1970). Методом лектин-блотингу здійснювали перенесення отриманих за допомогою електрофорезу білків на нітроцелюлозну мембрану.

Інтенсивність зв'язування лектинів з лейкоцитами крові та кількість зв'язаних клітин визначали методом протокової цитофлуориметрії. В дослідженні використовували сіалоспецифічні лектини макії амурської – МАА I та МАА II (Sigma, США), бузини чорної – SNA (Лектинтест, Україна). Аналіз проводили на протоковому цитометрі Coulter Epics XL. Розрахунок змін щільності експонування сіалових кислот проводили згідно з програмою FCS Express 3.

Експресію нейрамінідази аналізували за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі, використовуючи Mx 3000P QPCR («Stratagene», США) та SYBRGreen Mix («AB gene», Велика Британія).

Статистичну обробку та аналіз результатів проводили на персональному комп'ютері з використанням стандартних статистичних пакетів «STATISTICA» версія 6.1 (серійний номер AGAR 909 R455721FA). Для первинної підготовки таблиць та проміжних розрахунків використовували пакет Excel. Критичний рівень статистичної значимості (p) при перевірці статистичних гіпотез становив $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення сіалових кислот при гематоонкологічних захворюваннях. В результаті проведеного дослідження встановлено збільшення концентрації загальних сіалових кислот у плазмі крові хворих на лімфо- та мієлопроліферативні захворювання крові порівняно з групою гематологічно здорових донорів (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація загальних сіалових кислот у плазмі крові хворих на лімфо- і мієлопроліферативні захворювання крові

№	Група хворих, кількість досліджень	Концентрація СК, ммоль/л
1	Контрольна група, n=25	2,06±0,11
2	В-ХЛЛ, n=20	2,83 ±0,14*
3	Еритремія, n=25	2,95±0,13*
4	Сублейкемічний мієлоз, n=24	2,52±0,16*

Примітка. * – вірогідність відмінностей порівняно з контрольною групою при $p \leq 0,05$.

Загальний рівень сіалових кислот підвищується при хронічних лімфо- та мієлолейкозах, що може бути пов'язано з підсиленням біосинтезу і виходом у кров білків гострої фази (С-реактивний білок, альфа-1-кислий глікопротеїн, альфа-1-антитрипсин, альфа-1-макроглобулін, фібриноген, церулоплазмін), які містять сіалові кислоти. Ймовірно, підвищений вміст вільних СК може бути зумовлений зміною активності нейрамінідази, яка відщеплює залишки сіалових кислот від глікокон'югатів.

Відомо, що загальні СК у своєму складі містять вільні та зв'язані форми сіалових кислот. Тому було доцільним проведення додаткових досліджень щодо визначення концентрації вільних та зв'язаних СК для отримання більш повної інформації про їх роль в онкопроліферативних процесах. Встановлено збільшення концентрації вільних СК при В-ХЛЛ в 15,7 раза, при еритремії – в 15,8 раза, при сублейкемічному мієлозі – в 13,3

раза порівняно з групою контролю. Відношення кількості вільних сіалових кислот до загальних СК плазми крові незначно відрізняється при різних формах хронічних лейкозів і становить при В-ХЛЛ 42,9 %, при еритремії – 43,4 %, при сублейкемічному мієлозі 43,5 %.

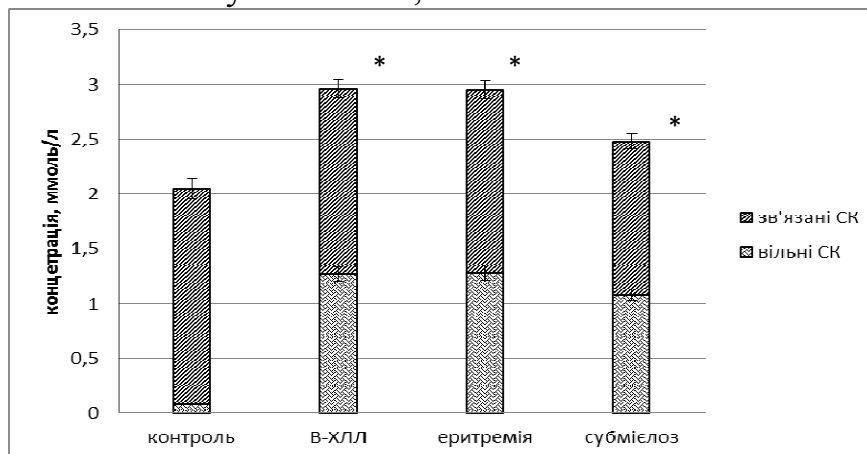


Рис. 1. Концентрація вільних та зв'язаних сіалових кислот (контрольна група n=25, В-ХЛЛ n=20, еритремія n=25, сублейкемічний мієлоз n=24)

Примітка. * – вірогідність відмінностей порівняно з контрольною групою при $p \leq 0,05$.

У хворих на В-хронічний лімфолейкоз була визначена концентрація загальних СК на різних етапах проведеного лікування. На першу добу проведеного лікування спостерігалася тенденція до зниження концентрації загальних СК, а після проходження стандартного курсу фармакотерапії – тенденція до їх підвищення.

Для більш детального вивчення впливу хіміотерапевтичного лікування досліджувана група хворих була розділена на 2 підгрупи в залежності від схеми лікування, що використовувалася. Так, I підгрупа отримувала лікування за схемою COP, що включає в себе циклофосфамід, онковін (вінкрістін), преднізолон. II підгрупа пацієнтів отримувала СНОР-терапію: вінкрістін, доскорубіцин, циклофосфамід, преднізолон. При використанні різних схем лікування В-ХЛЛ спостерігалися відмінності у значеннях рівня загальних СК. Так, при застосуванні COP-терапії на першу добу після проведеного лікування концентрація СК знизилася на 30,1 % відносно хворих до лікування. Після проходження курсу COP концентрація СК зменшилась на 15,7 % відносно початкових даних (рис. 2 А).

При використанні СНОР спостерігалася інша тенденція. На першу добу після отриманого лікування концентрація СК збільшилася на 9,87 % відносно величини до лікування. Після проходження курсу СНОР концентрація СК збільшилася на 10,75 % відносно початку лікування та на 21,7 % відносно даних до лікування (рис. 2 Б).

У групі хворих на В-хронічний лімфолейкоз до проведення хіміотерапевтичного лікування спостерігалось достовірне ($p \leq 0,05$) збільшення

вмісту ВСК, який значно перевищував показники норми і склав $(1,27 \pm 0,074)$ ммоль/л. На першу добу проведення стандартного курсу поліхіміотерапії на фоні зниження загального рівня сіалових кислот відбулося підвищення вмісту ВСК відносно показників до лікування на 24,2 %. Після проходження хіміотерапевтичного лікування рівень ВСК повернувся до значень, отриманих на початку лікування.

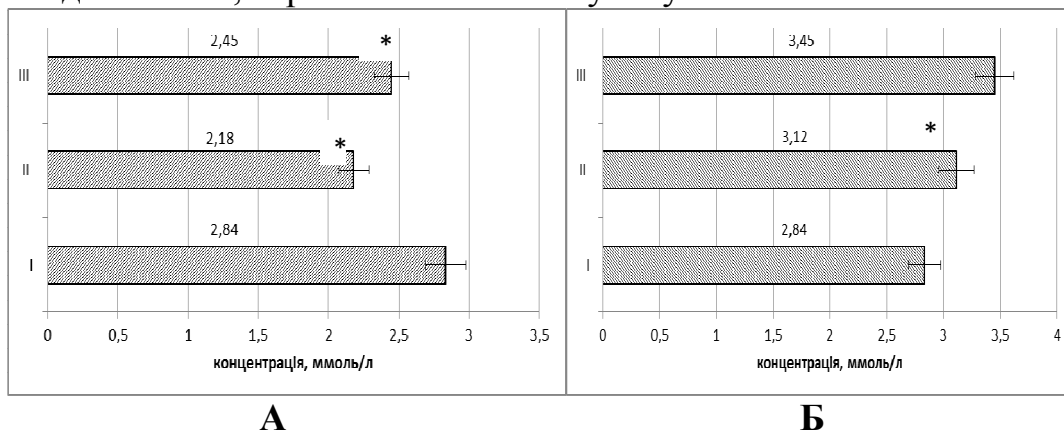


Рис. 2. Концентрація сіалових кислот при використанні COP терапії (А) та СНОР-терапії (Б) у хворих на В-ХЛЛ (І – до лікування, ІІ – на початку лікування, ІІІ – після лікування).

Примітка. * – вірогідність відмінностей порівняно з групою хворих до лікування при $p \leq 0,05$.

Також встановлено збільшення у плазмі крові до початку лікування в 2,6 раза кількості сіалових кислот, які зв'язують олігомери. На першу добу лікування та після його проведення значних відмінностей даного показника не виявилось. Щодо вмісту сіалових кислот, які зв'язані з білками, то встановлено зменшення їх концентрації на 73,6 % порівняно з групою гематологічно здорових донорів. Під час проведення поліхіміотерапії відбулося зниження цього показника на 56,2 % відносно групи хворих до лікування та на 75,1 % відносно норми. Після лікування рівень ПЗСК майже повернувся до значень, отриманих на початку лікування (рис. 3).

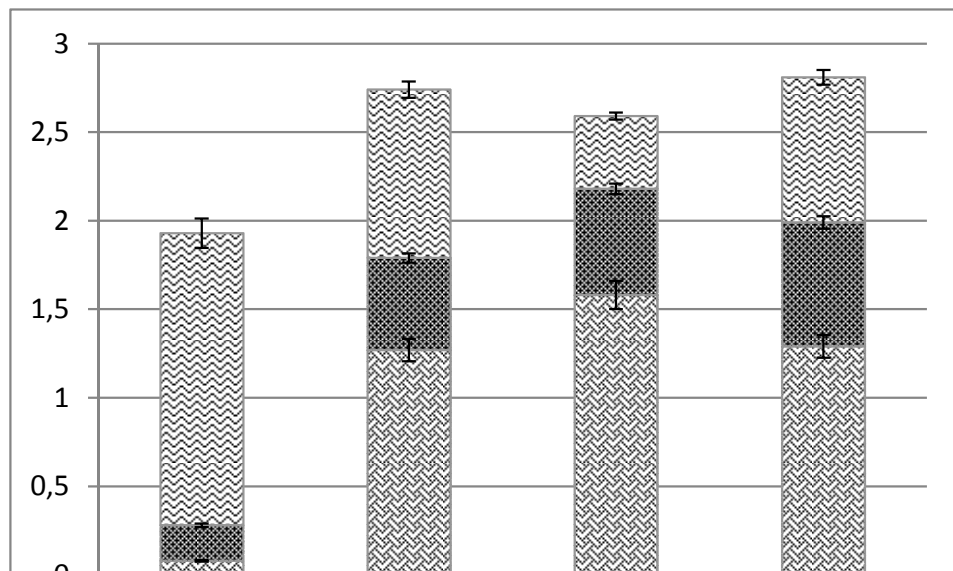


Рис. 3. Співвідношення різних форм СК: 1 – норма, 2 – ХЛЛ до лікування, 3 – ХЛЛ під час лікування, 4 – ХЛЛ після лікування. ПЗСК – протеїнозв’язані СК; ОЗСК – олігозв’язані СК; ВСК – вільні СК (n=20).

Електрофорез білків плазми крові з використанням сіалоспецифічного лектину Бузини чорної (SNA), у групі хворих на В-ХЛЛ, виявив появу білків з молекулярною масою 43-45, 50, та 70кДа та появу білка з молекулярною масою 80кДа, що відповідає глікопротеїну трансферину.

Отримані дані дозволяють припустити, що при різних формах лейкемій посилюються процеси десіалювання білків плазми крові. Це свідчить про участь глікопротеїнів у розвитку онкопроліферативних захворювань і може слугувати додатковим діагностичним критерієм.

Визначення активності нейрамінідази. З огляду на те, що рівень вільних сіалових кислот був підвищений при досліджуваних захворюваннях, що на нашу думку, зумовлено зміною активності нейрамінідази, яка відщеплює залишки СК від глікокон’югатів, проведено визначення активності даного ензиму. В результаті дослідження виявлено достовірне збільшення ($p \leq 0,05$) активності нейрамінідази у плазмі крові всіх досліджуваних груп хворих порівняно з групою гематологічно здорових донорів, показник активності якої становить $(53,78 \pm 12,19)$ mU/мл. Так, при В-ХЛЛ даний показник був збільшений на 25,5 % порівняно з групою контролю та становив $(67,48 \pm 5,68)$ mU/мл. Активність нейрамінідази була підвищена при еритремії на 37,7 % ($(72,48 \pm 5,68)$ mU/мл) та при сублейкемічному мієлозі на 47,9 % ($(79,55 \pm 6,12)$ mU/мл).

При В-ХЛЛ активність нейрамінідази була підвищена, порівняно з групою контролю, на 25,4 %. Уже на першу добу після отриманого курсу стандартної поліхіміотерапії за схемою COP показник активності нейрамінідази майже наблизився до значень норми. А після проходження усього курсу хіміотерапії досліджуваний показник знизився відносно норми на 25,5 % та на 22,6 % відносно хворих до проведення лікування (табл. 2).

Активність нейрамінідази при В-хронічному лімфолейкозі на різних етапах проведеного хіміотерапевтичного лікування (n=20)

№	Група хворих	Активність нейрамінідази, мU/мл
1	Контрольна група	53,78±12,19
2	В-ХЛЛ до лікування	67,48±5,68*
3	В-ХЛЛ під час лікування	60,01±12,19
4	В-ХЛЛ після лікування	43,86±6,83*

Примітка. * – вірогідність відмінностей порівняно з контрольною групою при $p \leq 0,05$.

Визначення сіалованості лімфоцитів крові. Проведення дослідження інтенсивності зв'язування лімфоцитів крові хворих на хронічні лейкози з сіалоспецифічними лектинами показало різний ступінь експонування сіалових кислот у складі глікокон'югатів плазматичної мембрани порівняно з групою здорових донорів. Інтенсивність зв'язування з $\alpha 2,3$ -сіалотопами визначали за допомогою лектину МАА ІІ – Макії амурської, що є афінним до послідовності NeuNAc($\alpha 2 \rightarrow 3$) Gal/DgalNAc. На поверхні лімфоцитів хворих на В-хронічний лімфолейкоз до проведення хіміотерапевтичного лікування визначено збільшення щільності експонування $\alpha 2,3$ сіалованих глікокон'югатів, порівняно з нормою, в 100 разів. Порівняльний аналіз цих же даних з групою контролю виявив, що показник експонування $\alpha 2,3$ -сіалотопів на лімфоцитах повертається до значень контрольної групи.

Отримані результати дослідження інтенсивності флуоресценції $\alpha 2,3$ -сіалотопів на мембранах патологічних лімфоцитів хворих на В-хронічний лімфолейкоз підтверджують, що злаякісна трансформація клітин призводить до структурних змін вуглеводної частини глікопротеїнів, а саме підвищення їх сіалованості, а цитостатична хіміотерапія є ефективною відносно цього показника.

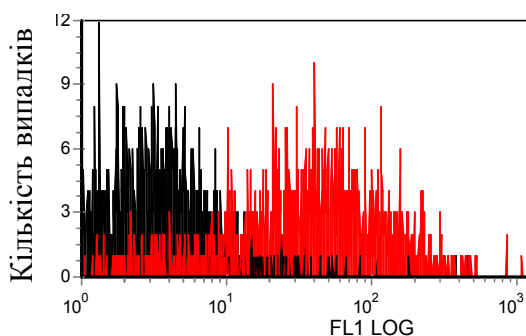


Рис. 4. Інтенсивність флуоресценції, мВ ФІТЦ-МАН ІІ в групах: гематологічно здорових донорів (чорна лінія) та хворих на хронічний лімфолейкоз до лікування (червона лінія).

За допомогою лектину бузини чорної (SNA), що є афінним до послідовності NeuNAc(α 2 \rightarrow 6)DGal/DgalNAc, була визначена щільність експонування α 2,6-сіалотопів на мембранах В-лімфоцитів хворих на В-хронічний лімфолейкоз. Визначаючи сіалюваність плазматичної мембрани лімфоцитів, виявлено збільшення щільності експонування α 2,6-сіалюваних глікотопів патологічних лімфоцитів у 100 разів порівняно з групою гематологічно здорових донорів. Це свідчить про збільшення експресії термінальних сіалових кислот на поверхні лімфоцитів. Інтенсивність зв'язування α 2,6-сіалюваних поверхневих глікокон'югатів, яка була визначена за допомогою SNA-ФІТЦ у групі хворих до проведення хіміотерапевтичного лікування та на першу добу проведення цитостатичної хіміотерапії, не показала відмінностей. Порівнявши інтенсивність флуоресценції лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ після проходження стандартного курсу хіміотерапії, встановили зниження рівня сіалюваності порівняно з першою добою лікування. Разом із тим, аналіз сіалюваності цієї ж групи показав зниження цього показника до контрольних значень. Дослідження впливу хіміотерапії на сіалюваність патологічних лімфоцитів при В-ХЛЛ показало позитивну динаміку. Порівнявши інтенсивність флуоресценції лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ після проходження стандартного курсу хіміотерапії, виявили зниження рівня сіалюваності порівняно з першою добою лікування.

Методом диференційного центрифугування було проведено виділення плазматичних мембран лімфоцитів, білки яких подальшому були розділені за допомогою Диск-електрофорезу. Перенесені білки, лектин-блотом, на нітроцелюлозну мембрану білки були проінкубовані з лектином Бузини чорної, для виявлення за рахунок, яких саме білків відбулося збільшення. Так були виявлені білки з молекулярною масою 140кДа, 105кДа, 58кДа.

Дослідження сіалюваності О-гліканів проводили за допомогою лектину МАН І, який є афінним до послідовності Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc. Провівши аналіз щільності експонування сіалотопів на поверхні В-лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ до початку хіміотерапевтичного лікування, відзначили збільшення цього показника в 10 разів порівняно з групою гематологічно здорових волонтерів. Подальше дослідження інтенсивності флуоресценції, визначеної за допомогою лектину МАН І, міченого фенілзотіюанатом, показало відмінності у групах хворих на В-ХЛЛ, які ще не отримували стандартного курсу хіміотерапії, та хворих на першу добу проведеного лікування. Показано зменшення щільності експонування α 2-3-сіалотопів уже на першу добу після введення лікарських засобів цитотоксичної дії відносно цих же хворих до початку лікування, але показник залишався вищим за норму. Порівняльний аналіз цього ж показника в групах хворих на першу добу проведення хіміотерапії та після її

проходження не виявив відмінностей. Отримані результати вказують на те, що сіаловані О-глікани присутні на лімфоцитах крові хворих на В-ХЛЛ, але меншою мірою, ніж N-глікани. Уже в першу добу лікування відбулося зниження досліджуваного показника до значень норми.

Зв'язування лектину бузини чорної (SNA) з лімфоцитами крові при справжній поліцетимії в 3,3 раза більше порівняно з контролем. Показник щільності експонування МААІІ-позитивних лімфоцитів збільшувався на 38 % порівняно з лімфоцитами здорових донорів. Вміст сіалових кислот на О-гліканах поверхневих глікопротеїнів лімфоцитарних мембран, який визначали за допомогою лектину МАА I, показав їх зменшення порівняно з контролем.

Для визначення механізмів зміни щільності експонування сіалових кислот на поверхні лімфоцитів був досліджений рівень експресії генів у лімфоцитах NEU1 за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції. Сіалідаза NEU1 має субклітинну локалізацію в мембрані, а також у межах лізосом. NEU1 регулює різноманітні важливі клітинні явища через десіалюваність поверхневих молекул.

У ході дослідження було встановлено значне збільшення експресії мРНК NEU1 на 79 % порівняно з групою контролю у розрахунку на експресію β -актину як контрольного гена. Показано наявність мРНК для нейрамінідази у лімфоцитах крові як здорових донорів, так і хворих на еритремію.

Під час дослідження показано збільшення експонування SNA-позитивних сіалотопів на плазматичній мембрані лімфоцитів хворих на сублейкемічний мієлоз у 4,5 раза порівняно з контролем. Показник експонування МАА ІІ-позитивних сіалотопів був збільшений у 3,5 раза. Протилежні результати отримано при використанні лектину МАА I. Показано зменшення ступеня сіалюваності плазматичних мембран на О-гліканах порівняно з групою контролю. При сублейкемічному мієлозі спостерігаються збільшення щільності експонування сіалових кислот у складі N-гліканів та зменшення їх кількості у складі О-гліканів, що підтверджується різним ступенем зв'язування із сіалоспецифічними лектинами.

Методом протокової цитофлуориметрії встановлено, що у групі гематологічних здорових донорів кількість лімфоцитів з α 2,6- і α 2,3-сіалюваними N-гліканами складає 15 і 25 % відповідно. У хворих на В-хронічний лімфолейкоз до проходження курсу поліхіміотерапії ці показники були вищими та мали такі значення: 56 % для SNA-зв'язаних глікотопів і 66,5 % для МАА ІІ-зв'язаних сіалових кислот. Таким чином, у хворих на В-ХЛЛ більше половини лімфоцитів, які циркулюють у кров, містять на своїй поверхні N-глікани з термінальними залишками сіалових кислот.

Отримані нами результати та дані літератури дозволяють стверджувати, що хронічні мієло- та лімфопрولیферативні захворювання крові викликають перерозподіл різних типів сіалових кислот плазми крові, зміну ступеня сіалюваності мембран лімфоцитів, активності ензимів, які

беруть участь в обміні глікопротеїнів плазми та лейкоцитів. Враховуючи роль сіалових кислот у складі глікокон'югатів плазми та мембран клітин крові, їх концентрацію, якісний та кількісний склад, можна судити про ефективність дії цитостатичних препаратів на пухлинні клітини та проводити дослідження щодо їх вдосконалення, використовуючи різні схеми фармакоterapiї.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та запропоновано нове вирішення актуального наукового завдання, що полягає у встановленні участі вуглеводної частини глікопротеїнів плазми та залишків сіалових кислот мембран лімфоцитів у розвитку і перебігу хронічних лімфо- та мієлопроліферативних захворювань крові.

1. Вміст сіалових кислот у плазмі крові та входження їх до складу глікопротеїнів лімфоцитів змінюються при онкопроліферативних захворюваннях порівняно з клітинами крові гематологічно здорових донорів. Концентрація загальних сіалових кислот у плазмі крові зростає при В-хронічному лімфолейкозі на 37,4 % ($p \leq 0,05$), справжній поліцитемії – на 43 % ($p \leq 0,05$), сублейкемічному мієлозі – на 22,3 % ($p \leq 0,05$).
2. Проведення цитостатичної терапії за схемою COP (циклофосфамід, онковін (вінкрістін), преднізолон) викликало зниження концентрації загальних сіалових кислот на 30 % уже на першу добу проведеного лікування з подальшим зростанням після закінчення хіміотерапії, одна їх концентрація залишалася вірогідно нижчою (на 16 %) порівняно з даними до початку лікування. При застосуванні СНОР терапії (вінкрістін, доскорубіцин, циклофосфамід, преднізолон) спостерігали іншу тенденцію, а саме збільшення концентрації загальних сіалових кислот на 10 % відносно величини до лікування та подальше її зростання на 22 % після завершення курсу терапії.
3. В-хронічний лімфолейкоз супроводжується перерозподілом різних форм сіалових кислот порівняно з нормою: зростає вміст вільних (в 15,8 раза) та олігомерних (в 2,6 раза) сіалових кислот, а протеїнозв'язаних – знижується (на 73,6 %). При проведенні цитостатичної терапії концентрація вільних сіалових кислот також підвищується, а протеїнозв'язаних – знижується. Після закінчення лікування усі досліджувані показники повертаються до значень, які були перед використанням протипухлинних препаратів.
4. У хворих на мієло- та лімфопроліферативні захворювання крові достовірно збільшується активність нейрамінідази порівняно з контролем: при В-ХЛЛ – на 25,5 %, при справжній поліцитемії – на 37,7 %, при сублейкемічному мієлозі – на 47,9 %. Цитостатична терапія у хворих на В-хронічний лімфолейкоз призводить до зниження активності нейрамінідази на 22,6 % відносно значень цього показника у хворих до

початку лікування та має однакову спрямованість з динамікою змін концентрації загальних сіалових кислот у плазмі крові.

5. Злоякісна трансформація лейкозних клітин призводить до зміни розподілу лімфоцитів крові, які несуть на своїй поверхні залишки сіалових кислот. Так, при В-хронічному лімфолейкозі збільшується їх кількість у складі О- та N-гліканів, а при проведенні цитостатичної терапії спостерігається зменшення сіалованості мембран лімфоцитів, що може бути критерієм ефективності лікування. При сублейкемічному мієлозі та справжній поліцетимії ступінь сіалювання лімфоцитів менше виражений, ніж при В-ХЛЛ.
6. Кількість лімфоцитів крові, які містять на своїй поверхні N-глікани з термінальними $\alpha 2,3$ - та $\alpha 2,6$ -сіаловими кислотами, збільшується при В-ХЛЛ. При проведенні курсу хіміотерапії, на всіх її етапах, кількість SNA-позитивних лімфоцитів збільшується, а кількість МААІІ-позитивних лімфоцитів зменшується.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Нетроніна О. В.** Вільні та зв'язані форми сіалових кислот у плазмі крові хворих на хронічний лімфолейкоз / О. В. Нетроніна // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина. – 2015. – № 6 (2). – С.108–112. *(Дисертантка спланувала експеримент і виконала його, опрацювала дані літератури, провела узагальнення результатів, підготувала статтю до друку).*

2. Сіальованість глікопротеїнів і рівень експресії нейрамінідази NEU1 та сіалілтрансферази ST6GAL1 у лімфоцитах хворих на еритремію / Г. С. Маслак, **О. В. Костюк**, Д. О. Мінченко, О. З. Бразалук, А. І. Шевцова, О. Г. Мінченко // Фізіол.журнал. – 2014. – Т. 60, № 5. – С. 14–22. *(Дисертантка провела виділення лімфоцитів крові, визначила концентрацію сіалових кислот у плазмі крові).*

3. Ступінь сіальованості й галактазильованості глікопротеїнів плазми крові за умов алкілюючої поліхіміотерапії хворих на хронічний лімфолейкоз / Г. С. Маслак, О. В. Костюк, А. О. Кулініч, І. В. Машейко // Біологічні студії. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 5–19. *(Дисертантка здійснила аналіз літератури, матеріали до друку підготувала у співавторстві).*

4. Маслак Г. С. Сироваточний рівень сіалових кислот та активність нейрамінідази за умов хронічного лімфолейкозу та на фоні хіміотерапевтичного лікування / Г. С. Маслак, **О. В. Костюк**, О. З. Бразалук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. Вернадського. Серія «Біологія, хімія». – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С. 105–111. *(Дисертантка визначила концентрацію сіалових кислот, провела аналіз наукової літератури)*

5. Костюк О. В. Влияние алкилирующей терапии на сиалированность мембран лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе / **О. В. Костюк**, А. С. Маслак, А. З. Бразалук // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2015. – № 1 (13). – С. 120–128. *(Дисертантка провела визначення щільності експонування сіалових кислот на лімфоцитах крові, узагальнення результатів, оформлення статті).*

6. Содержание α -1 кислого глікопротеїна и сиаловых кислот в биологических жидкостях у больных с хроническими миелопролиферативными заболеваниями / А. С. Маслак, **О. В. Костюк**, И. В. Машейко, А. З. Бразалук // Журнал Гродненського державного медичинського університету. – 2013. – № 1. – С. 39–42. *(Дисертантка провела визначення концентрації сіалових кислот у крові та сечі, матеріали до друку підготувала у співавторстві).*

7. Кількісні зміни вуглеводних детермінант глікокон'югатів лімфоцитарних мембран при В-ХЛЛ / **О. Костюк**, Г. Маслак, Н. Паша, П. Каплан, Г. Пелешенко, О. Бразалук // Матеріали XI Міжнародної наукової конференції «Молодь і поступ біології» (20–23 квітня 2015). – Львів, 2015. –

С. 64–65. *(Дисертантка провела частину експериментальних досліджень, підготувала матеріали до друку).*

8. **Костюк О. В.** Рівень сіалових кислот та сіальованість мембран лімфоцитів при В-хронічному лімфолейкозі на фоні застосування хіміотерапевтичного лікування / О. В. Костюк // Матеріали Третьої міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (24–25 вересня 2015). – Дніпропетровськ, 2015. – С. 125–126. *(Дисертант провела самостійно експериментальні дослідження, підготувала матеріали до друку).*

9. Порівняльний аналіз лімфоцитів крові за умов цитостатичної хіміотерапії хворих на В-хронічний лімфолейкоз / Г. С. Маслак, **О. В. Костюк**, Н. С. Паша, О. З. Бразалук // Матеріали XI Українського біохімічного конгресу (6–10 жовтня 2014). – К., 2014. ISSN 0201-8470. Ukr.Biochem.J, 2014, Vol. 86, № 5 (Suppl. 2). *(Дисертантка провела частину експериментальних досліджень, підготувала матеріали до друку у співавторстві)*

10. **Костюк О. В.** Вміст лімфоцитів із α -2,6 та α -2,3-сіальованими N-гліканами у хворих на хронічний лімфолейкоз / О. В. Костюк, Г. С. Маслак, А. З. Бразалук // Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» (26–27 вересня 2013). – Дніпропетровськ, 2013. – С. 59–60. *(Дисертантка провела частину експериментальних досліджень, обробила літературні дані, підготувала матеріали до друку).*

11. Маслак Г. Розподіл лейкоцитів із внутрішньоклітинними та експонованим фібронектином у хворих на В-клітинну лімфому / Г. Маслак, О. Костюк, О. Бразалук // Матеріали Другої міжнародної наукової конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (24–25 вересня 2013). – Дніпропетровськ, 2013. – С. 41. *(Дисертантка провела частину експериментальних досліджень, матеріали до друку підготувала у співавторстві).*

12. Diagnostic value of determination of levels of sialic acid in oncology blood / O. V. Kostyuk, A. S. Maslak, N. S. Pasha, A. Z. Brazaluk // Матеріали VII Львівсько-Люблінської конференції «Сучасні аспекти експериментальної та клінічної біохімії» (May 23-24 2013). – Lviv, 2013. – P. 84. *(Дисертантка провела частину експериментальних досліджень, матеріали до друку підготувала у співавторстві).*

13. Маслак Г. С. Аналіз розподілу лімфоцитів, що експонують A1-кислий глікопротеїн та фібронектин у хворих із хронічними лімфолейкозами / Г. С. Маслак, **О. В. Костюк**, А. О. Кулініч // Матеріали X Міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців Шевченківська весна (19-23 березня 2012). – К., 2012. – С. 202–203. *(Дисертантка провела аналіз літературних джерел, матеріали до друку підготувала у співавторстві).*

14. Концентрація та сіальованість альфа-1 кислого глікопротеїну плазми крові при вірусних гепатитах і цирозі печінки / І. В. Машейко, **О. В.**

Костюк, Г. С. Маслак, О. З. Бразалук // Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (5–8 квітня 2011). – Львів, 2011. – С. 62–63. (Дисертантка провела аналіз літературних джерел, матеріали до друку підготувала у співавторстві).

15. Пат. на винахід № 109477. Спосіб діагностики трансформації істинної поліцитемії у сублейкемічний мієлоз / Маслак Г. С., Машейко І. В., Стекленьова Н. І., Костюк О. В., Шевцова А. І., Бразалук О. З. Бюл. № 16 від 25.08.15 р. (Дисертантка провела аналіз літературних джерел).

АНОТАЦІЯ

Нетроніна О.В. Сіалові кислоти плазми та сіальованість лімфоцитів при хронічних лімфо- і мієлопроліферативних захворюваннях крові. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України». Тернопіль, 2016.

У дисертаційній роботі проведені дослідження участі вуглеводної детермінанти глікопротеїнів плазми та залишків сіалових кислот мембран лімфоцитів у розвитку і перебігу хронічних лімфо- та мієлопроліферативних захворювань крові, проаналізований вплив хіміотерапевтичного лікування на процеси сіалювання/десіалювання глікопротеїнів плазми та мембран лімфоцитів.

Встановлено збільшення концентрації загальних сіалових кислот у плазмі крові хворих на онкогематологічні захворювання. Виявлено, що при В-хронічному лімфолейкозі, еритремії та сублейкемічному мієлозі спостерігається підвищення концентрації вільних сіалових кислот на одному рівні.

Визначено, що злаякісна трансформація лейкозних клітин призводить до зміни розподілу лімфоцитів крові, які несуть на своїй поверхні залишки сіалових кислот. Так, при В-хронічному лімфолейкозі збільшується їх кількість у складі О- та N-гліканів, а при проведенні цитостатичної терапії спостерігається зменшення сіальованості мембран лімфоцитів, що може бути критерієм ефективності лікування.

Ключові слова: сіалові кислоти, глікокон'югати, лімфоцити, онкопроліферативні захворювання крові.

АННОТАЦИЯ

Нетренина О.В. Сиаловые кислоты плазмы и сиалированность лимфоцитов при хронических лимфо- и миелопролиферативных заболеваниях крови. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Государственное высшее учебное заведение «Тернопольский государственный медицинский университет имени И.Я. Горбачевского МОЗ Украины». Тернополь, 2016.

В диссертационной работе проведены исследования участия углеводной детерминанты гликопротеинов плазмы и остатков сиаловых кислот мембран лимфоцитов в развитии и течении хронических лимфо- и миелопролиферативных заболеваний крови, проанализировано влияние химиотерапевтического лечения на процессы сиалирования/десиалирования гликопротеинов плазмы и мембран лимфоцитов.

Установлено увеличение концентрации общих сиаловых кислот в плазме крови больных онкогематологическими заболеваниями. Выявлено, что при В-хроническом лимфолейкозе, эритремии и сублейкемическом миелозе наблюдается повышение концентрации свободных сиаловых кислот на одном уровне, также мало отличается и отношение свободных сиаловых кислот в общих СК плазмы крови, а соотношение свободных сиаловых кислот к общему белку имело разные величины и зависело от формы лейкемии.

Впервые показано, что при проведении СОР-терапии (винкристин, доксорубин, циклофосфамид, преднизолон) произошло снижение концентрации общих сиаловых кислот до начала лечения с последующим их уменьшением после прохождения курса химиотерапии. При использовании СНОР-терапии (винкристин, доксорубин, циклофосфамид, преднизолон) обнаружена другая тенденция, а именно увеличение концентрации общих сиаловых кислот от начала до завершения лечения.

Определено, что при хроническом В-лимфолейкозе количество свободных сиаловых кислот плазмы крови нарастало, а после проведения лечения несколько уменьшалось. Применение химиотерапии приводило к изменению соотношения между различными формами сиаловых кислот, а именно нарастало количество свободных и олигосвязанных форм, а протеинсвязанных – снижалось.

При различных формах лейкемии усиливаются процессы десиалирования белков плазмы крови, что свидетельствует об участии гликопротеинов в развитии онкопролиферативных заболеваний и может служить дополнительным диагностическим критерием.

Выявлено повышение активности нейраминидазы при различных формах онкогематологических заболеваний и показано, что наиболее выразительными были изменения при сублейкемическом миелозе и совпадает с увеличением концентрации свободных сиаловых кислот в плазме крови. Снижение активности нейраминидазы под влиянием цитостатической

терапии свидетельствует о чувствительности этого показателя и может использоваться для оценки химиотерапевтического вмешательства.

Показано, что среди лейкоцитов больше на своей поверхности содержат остатки сиаловых кислот лимфоциты и злокачественная трансформация изменяет распределение таких лимфоцитов.

Определено, что увеличивается сиалированность мембран лимфоцитов в крови больных В-хроническом лимфолейкозом, а при истинной полицитемии и сублейкемическом миелозе сиалированность мембран лимфоцитов выражена в меньшей степени.

Определено, что злокачественная трансформация лейкозных клеток приводит к изменению распределения лимфоцитов крови, которые несут на своей поверхности остатки сиаловых кислот. Так, при В-хроническом лимфолейкозе увеличивается их количество в составе О- и N-гликанов, а при проведении цитостатической терапии наблюдается уменьшение сиалированности мембран лимфоцитов, может быть критерием эффективности лечения. При сублейкемическом миелозе наблюдаются увеличение плотности экспонирования сиаловых кислот в составе N-гликанов и уменьшение их количества в составе О-гликанов, что подтверждается разной степенью связывания с сиалоспецифическими лектинами. При истинной полицитемии степень сиалированности лимфоцитов менее выражена, нежели при В-ХЛЛ.

Применение химиотерапевтических препаратов приводило к увеличению количества сиаловых кислот по α 2,6 связи и к уменьшению по α 2,3 связи. У больных В-хроническим лимфолейкозом алкилирующих терапия снижает количество лимфоцитов с повышенным содержанием сиаловых кислот на их поверхности.

Хронические миело- и лимфопролиферативные заболевания крови вызывают перераспределение различных типов сиаловых кислот плазмы крови, изменение степени сиалированности мембран лимфоцитов, активности ферментов, участвующих в обмене гликопротеинов плазмы и лейкоцитов. Учитывая роль сиаловых кислот в составе гликоконъюгатов плазмы и мембран клеток крови, их концентрацию, качественный и количественный состав, можно судить об эффективности действия цитостатических препаратов на опухолевые клетки и проводить исследования по их совершенствованию, используя различные схемы фармакотерапии.

Ключевые слова: сиаловые кислоты, гликоконъюгаты, лимфоциты, онкопролиферативные заболевания крови.

SUMMARY

Netronina O.V. Plasma sialic acids and sialylation of lymphocytes in chronic lympho- and myeloproliferative blood diseases. – A manuscript.

Thesis for a scientific degree of candidate of biological sciences by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – SHEI «I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University Ministry of Health of Ukraine», Ternopil, 2016

The dissertation study of involvement of carbohydrate determinant of plasma glycoproteins and of residues of sialic acids of membranes of lymphocytes in the development and course of chronic lympho- and myeloproliferative blood diseases was undertaken, and the influence of chemotherapeutic treatment on the processes of sialylation/desialylation of plasma glycoproteins and of membranes of lymphocytes was analyzed.

The increase in the concentration of total sialic acids in blood plasma of patients with oncohematological diseases is installed.

The treatment with chemotherapeutic drugs has led to increase the amount of sialic acids in α 2,6 linkage and to a decrease in α 2,3 linkage. In patients with B-chronic lympholeucosis the alkylating therapy reduces the number of lymphocytes with increased content of sialic acids on their surface.

Key words: sialic acids, glycoconjugates, lymphocytes, oncoproliferative diseases of blood.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ТБК – тіобарбітурова кислота
ТХО – трихлороцтова кислота
GalNAc – N-ацетилгалактозамін
GlcNAc – N-ацетилглюкозамін
МАО – лектин акації амурської (*Maackia amurensis*)
NeuNAc – N-ацетилнейрамінова кислота
SNA – лектин бузини чорної (*Sambucus nigra*)
СК – сіалові кислоти
Neu5Gc-N – гліколілнейрамінова кислота
BCR – рецептор В-лімфоцитів
В-ХЛЛ – В-хронічний лімфолейкоз
ХіМФ – хронічний ідіопатичний мієлофіброз
СП – справжня поліцитемія
АГП – α 1 кислий глікопротеїн
Man – маноза
Glc – глюкоза
Neu – нейрамінідаза
TCR – рецептор Т-клітин
JAK2 – ген янускінази
ЛДГ – лактатдегідрогеназа
ММП – матриксні металопротеїнази

БСА – сироватковий альбумін
ВСК – вільні сіалові кислоти
ОЗСК – олігозв'язані сіалові кислоти
ПЗСК – протеїнозв'язані сіалові кислоти
ЕДТА – етилендіамінтетраацетатна кислота
АФП – альфа-фетопротейн
ФІТЦ – флуоресцеїнізотіоціанат
ЗФР – забуферений фізіологічний розчин

Підписано до друку 25.05.2016. Формат 60×84/16.
Папір друкарський. Друк офсетний.
Умовн. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам. № 134.

Видавництво Тернопільського державного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського.
Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001, Україна.