

**О.М.Хижняк**  
**Н.І.Стеклєньова**

Дніпропетровська державна  
медична академія

УДК 577.112.85:575.6:616-006

## **ХАРАКТЕРИСТИКА ПОВЕРХНЕВИХ ГЛІКОКОН'ЮГАТІВ КЛІТИН КРОВІ ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ НА АДЕНОМУ ТА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ**

**Ключові слова:** поверхневі  
глікокон'югати, щитоподібна  
залоза, рак, аденома, клітини  
крові.

*Надійшла: 11.10.2006*

*Прийнята: 04.01.2007*

**Резюме.** В роботі проведений аналіз структури поверхневих глікокон'югатів клітин крові у хворих на аденому та рак щитоподібної залози. Були досліджені пацієнти віком від 35 до 50 років, розділені на три групи: 1. Група хворих на аденому щитоподібної залози; 2. Група хворих на рак щитоподібної залози; 3. Пацієнти без патології щитоподібної залози. Мазки крові забарвлювали альціановим синім з метою візуалізації поверхневих глікокон'югатів, до складу яких входять сульфатні групи та сіалова кислота, а також проводили десіалювання мембран шляхом обробки нейрамінідазою для визначення співвідношення сульфатованих та сіалованих олігосахаридів. Вивчена характеристика розподілення гістохімічно-позитивних ділянок на мембранах клітин, а також їх кількісна характеристика. Проведений порівняльний аналіз структурних особливостей глікокон'югатів мембран різних клітин крові у хворих на аденому та рак щитоподібної залози, а також вивчені вказані характеристики у нормі. Встановлено, що у хворих на аденому та рак щитоподібної залози спостерігається зниження кількості сіалованих кінцевих залишків D-галактози на поверхні еритроцитів, лейкоцитів, а також зміна співвідношення сульфатованих та сіалованих залишків олігосахаридів у складі рецепторних комплексів вказаних клітин.

**Khiznyak O.M., Stecleneva N.I. The characteristic of the superficial glycoconjugates of blood cells at thyroid adenoma and cancer.**

**Summary:** The analysis of superficial glycoconjugates structures on the blood cells has been done in patients with thyroid gland cancer and adenoma. The patients at the age from 35 to 50 years old was examined and divided into three groups: 1. patients with thyroid gland adenoma; 2. patients with thyroid gland cancer; 3. patients with intact thyroid gland. The blood smears were stained with alcian-blue with the purpose of visualization of superficial glycoconjugates which consist of sulfated groups and sialic acid. The membrane desialation was also performed by neuraminidase treatment to examine sulfated and sialated oligosaccharides correlation. The distribution of the histochemical- positive areas on the cell membrane has been studied with their quantitative features. The comparative analysis of the superficial glycoconjugates on the blood cells structure has been made in patients with thyroid gland adenoma and cancer, and with normal blood cells. The decrease of amount of sialated D-galactose rests has been determined in erythrocytes, granulocytes and agranulocytes surface in patients with thyroid cancer. The correlation between sulfated and sialated oligosaccharide rests as a receptors complex of the cells was also found to be altered.

**Key words:** superficial glycoconjugates, thyroid gland, cancer, adenoma, blood cells.

### **Вступ**

Рецепторний апарат клітини є одним з найважливіших систем, що забезпечує її життєдіяльність. Кількість рецепторів при різних умовах функціонування клітини може змінюватись, але структура їх залишається відносно стабільною. Однак при різних патологічних станах, насамперед онкозахворюваннях, відбувається відомінення кількісних та якісних характеристик поверхневих глікокон'югатів клітин. Вивчення цих змін стало в основу цілого напрямку науки – пошуку ранніх онкомаркерів шляхом дослідження рецепторного апарату онкотрансформованих та імункомпетентних клітин.

У склад плазматичної мембрани входять в більшості глікопротеїни, вуглеводна складова яких у вигляді олігосахаридних ланцюгів утворює надмембранний комплекс, що відіграє ключову роль не тільки у клітинній рецепції, а і у механізмах міграції, адгезії, проліферації (Chang Y. et al., 2006). Участь у взаємодії клітин з міжклітинним матриксом, а також формування адгезивних влас-

тностей клітин, відбувається завдяки групі плазматичних рецепторів – інтегринам (Берман А.С. та співавт., 2003). Порушення при онкозахворюваннях механізмів взаємодії з протеїнами аморфної речовини та взаємовідносин з оточуючими клітинами внаслідок зміни рецепторного апарату відбувається, в першу чергу, у самих онкотрансформованих клітин (Lemamy G. et al., 1999); при цьому відомінення поверхневих глікокон'югатів відбувається і на клітинах крові.

Біохімічна структура вуглеводного компоненту поверхневих глікокон'югатів еритроцитів та лейкоцитів у нормі та при гемобластозах вивчена багатьма дослідниками (Bilyu R., Stoika R., 2003; Kim K. et al., 2006). Залишаються при цьому недостатньо зрозумілими механізми біохімічної трансформації рецепторного комплексу клітин крові у відповідь на малігнізацію у будь-якому органі. Встановлення фактів появи специфічних олігосахаридних комплексів у складі мембрани еритроцитів та лейкоцитів при онкозахворюваннях, чи, навпаки, зникнення нормальних рецепто-

рів - шлях до знайдення ранніх ознак малігнізації.

**Метою** нашого дослідження було вивчення змін структури вуглеводного компоненту поверхневих глікокон'югатів еритроцитів та лейкоцитів при захворюваннях на аденому та рак щитоподібної залози (ЩЗ).

#### Матеріали та методи

Досліджувані пацієнти були розподілені на декілька груп: група А – хворі на різні форми аденоми ЩЗ; група В – контрольна, складалась із здорових пацієнтів. Середній вік групи А склав  $38,5 \pm 1,4$  р., групи В -  $48 \pm 2,5$  р.; в контрольній групі цей показник становив  $43,5 \pm 2,3$  р. Обстеженню підлягали жінки і чоловіки в рівній кількості в кожній дослідній групі. Всього було досліджено 32 людини. Фіксацію мазків крові, зроблених на склі, проводили шляхом висушування на повітрі протягом 2 годин при кімнатній температурі, після чого забарлювали альціановим синім 8 GX (1%) у 3% оцтової кислоті при рН 2,5 протягом 30 хвилин з метою візуалізації сульфатованих та сіалюваних глікопротеїнів, що входять до складу мембран. Процедуру десіалювання проводили ферментативним гідролізом з нейрамінідазою. Для цього висушені зрізи інкубували 10 год при температурі  $39^\circ\text{C}$  у розчині нейрамінідази (*Vibrio cholerae*) у 0,1 М ацетатному буфері з 1% NaCl та 0,1% CaCl<sub>2</sub>, рН 5,5. Рівень інтенсивності гістохімічної реакції оцінювали напівкількісним методом у балах від 0 до 3.

Результати дослідження та їх обговорення. При мікроскопічному дослідженні мазків крові пацієнтів групи А, забарвлених альціановим синім, встановлено особливості розподілення поверхневих глікокон'югатів та різну інтенсивність забарвлення поверхні клітин (табл. 1).

Результати дослідження та їх обговорення.

При мікроскопічному дослідженні мазків крові пацієнтів групи А, забарвлених альціановим синім, встановлено особливості розподілення поверхневих глікокон'югатів та різну інтенсивність забарвлення поверхні клітин (табл. 1).

Таблиця 1

Розподілення поверхневих глікокон'югатів з сульфатованими та сіалюваними олігосахаридами на клітинах крові у групі А

Клітини	Кількість гістохімічно позитивних клітин, % (M±m)	Кількість гістохімічно позитивних клітин після обробки нейрамінідазою, % (M±m)	Інтенсивність забарвлення гістохімічно позитивних ділянок у балах	
			до дії нейрамінідази	після ферментативного гліколізу
Еритроцити	$57,1 \pm 4,9$	$40,3 \pm 4,2$	3	2
Гранулоцити	$8,8 \pm 0,9$	$4,7 \pm 0,5$	1	1
Агранулоцити	$6,7 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,5$	1	1

Позначення: 0 балів – немає забарвлення, 1 бал – менше 10% гістохімічно-позитивних клітин, 2 бали – від 10 до 50% гістохімічно-позитивних клітин, 3 бали – забарвлення більше 50% клітин.

Поверхня прореагувавших еритроцитів мала гетерогенний характер забарвлення з чередуванням слабо- та різкопозитивних ділянок. Розміри останніх коливались від 5 до 18 мкм завдовжки. Кількість клітин, що мали на поверхні ознаки позитивної реакції, перевищували 50%, але при цьому вона була меншою за таку у контрольній групі на 16,1% ( $p < 0,05$ ). Після проведення реакції з нейрамінідазою кількість прореагувавших клітин зменшилася на 16,8% у межах групи.

Оскільки гістохімічна реакція з альціановим синім дає змогу візуалізувати поверхневі глікокон'югати, які містять олігосахариди з сульфатною групою чи сіалювою кислотою, слід припустити, що після проведення ферментативного гідролізу нейрамінідазою відбувається забарвлення олігосахаридів лише з сульфатованими залишками. Отже, кількість вуглеводних залишків, що "випали" з реакції після ферментативної обробки, в еритроцитах групи А склала 29,4%. Цей показник у 3 рази менше порівняно з групою контролю. Тобто кількість рецепторів еритроцитів, що мають у своєму складі сіалювані кінцеві залишки D-галактози, була значно меншою порівняно з нормою.

Гранулярні та агранулярні лейкоцити в усіх досліджуваних групах ми оцінювали окремо. Було встановлено, що кількість сіалюваних глікокон'югатів на поверхні грануло- та агрануло-

цитів у групі А дорівнювала 46,6% та 11,9% ( $p < 0,05$ ) відповідно що у 1,7 та 3,8 разів менше порівняно з групою В.

Мікроскопія гістохімічно оброблених мазків крові пацієнтів групи В дозволила встановити деякі особливості структури поверхневого комплексу еритроцитів та лейкоцитів. Насамперед це зменшення кількості гістохімічно-позитивних еритроцитів та гранулоцитів порівняно з групою контролю та, навпаки, збільшення прореагувавших агранулоцитів (табл. 2).

Після ферментативної обробки нейрамінідазою мазків кількість ділянок хімічно-позитивних рецепторів на поверхні еритроцитів зменшилася незначно, що свідчить про порушення сіалювання залишків D-галактози скоріше як пристосування до онкопроцесу, що розвивається у щитоподібній залозі. Паралельно з тим, ми спостерігали специфічне збільшення кількості позитивних ділянок на поверхні гранулоцитів після обробки нейрамінідазою майже у два рази. Ми припускаємо, що це є результатом формування рецепторних конгломератів у надмембранному комплексі гранулоцитів внаслідок формування глікозидних зв'язків між розгалуженнями олігосахаридів та маскування активних центрів зв'язування з лігандом. Ферментативна обробка цих патологічних утворень призводить до руйнування глікозидних зв'язків та збільшення кількості ак-

тивних зв'язувальних центрів.

Таблиця 2

Розподілення поверхневих глікокон'югатів з сульфатованими та сіалюваними олігосахаридами на клітинах крові у групі Б

Клітини	Кількість гістохімічно позитивних клітин, % (M±m)	Кількість гістохімічно позитивних клітин після обробки нейрамінідазою, % (M±m)	Інтенсивність забарвлення гістохімічно позитивних ділянок у балах	
			до дії нейрамінідази	після ферментативного гліколізу
Еритроцити	49,2±5,1	31,9±3,4	2	2
Гранулоцити	9,1±1,0	18,5±2,1	1	2
Агранулоцити	13,5±1,1	8,9±0,9	2	1

Позначення: 0 балів – немає забарвлення, 1 бал – менше 10% гістохімічно-позитивних клітин, 2 бали – від 10 до 50% гістохімічно-позитивних клітин, 3 бали – забарвлення більше 50% клітин.

Дослідження поверхні агранулярних лейкоцитів до та після ферментативного гідролізу вказало на зниження кількості сіалюваних залишків

D-галактози порівняно з групою В на 11,7% (p<0,05) (табл. 3).

Таблиця 3

Розподілення поверхневих глікокон'югатів з сульфатованими та сіалюваними олігосахаридами на клітинах крові у групі В

Клітини	Кількість гістохімічно позитивних клітин, % (M±m)	Кількість гістохімічно позитивних клітин після обробки нейрамінідазою, % (M±m)	Інтенсивність забарвлення гістохімічно позитивних ділянок у балах	
			до дії нейрамінідази	після ферментативного гліколізу
Еритроцити	73,2±7,9	8,3±0,9	3	1
Гранулоцити	37,7±3,6	7,8±0,8	2	1
Агранулоцити	5,9±0,6	3,2±0,3	1	1

Позначення: 0 балів – немає забарвлення, 1 бал – менше 10% гістохімічно-позитивних клітин, 2 бали – від 10 до 50% гістохімічно-позитивних клітин, 3 бали – забарвлення більше 50% клітин.

Окрім порушення кількості сіалюваних та сульфатованих вуглеводних залишків у складі поверхневих глікокон'югатів еритроцитів та лейкоцитів у групі А та Б спостерігалось порушення співвідношення вищевказаних структур. Так у групі В (контроль) співвідношення сульфатованих та сіалюваних вуглеводних залишків на поверхні еритроцитів, грануло- та агранулоцитів становило 1:7,8; 1:3,8 та 1,2:1 відповідно. У групі А цей показник дорівнював: 2,4:1 – в еритроцитах, 1,1:1 – у гранулоцитах, 7,4:1 – у агранулоцитах. Група Б характеризувалась наступною картиною: співвідношення сульфатованих та сіалюваних вуглеводних залишків поверхневих глікокон'югатів еритроцитів дорівнювало 1,8:1, агранулоцитів 1,9:1.

Аналізуючи отримані результати ми встановили, що при захворюваннях на аденому та рак щитоподібної залози спостерігається зменшення сіалової кислоти на поверхні мембран клітин крові порівняно з нормою, та дійшли висновку про зміни структурно-функціональних властивостей еритроцитів та лейкоцитів в аспекті їх циркуляторних та міграційних характеристик. Це збігається з даними Balsoni G. et al. (2000), який вказує на те, що фактор сіалових кислот відіграє важливу роль у феномені підвищеної аглютинабельності клітин. Зниження вмісту сіалових кислот на поверхні мембран призводить до зниження її загального негативного заряду. Це у свою

чергу сприяє порушенню процесів міграції лейкоцитів. Формування поверхневого рецепторного комплексу клітин крові в процесі нормального розвитку супроводжується сіалюванням олігосахаридів та маскуванням кінцевих залишків D-галактози. Відповідно, зменшення кількості сіалових кислот на поверхні клітини призводить до збільшення їх адгезивних властивостей.

Вивчення рецепторної функції клітин дозволило встановити, що поверхневі глікокон'югати з кінцевими залишками D-галактози з'являються в ситуаціях, коли взаємодія між клітинами потребує високого ступеня авідності (наприклад, елімінація дефектних клітин системою мононуклеарів і т.п.). Це підтверджується результатами наших досліджень, які вказують саме на збільшення залишків D-галактози на поверхні лейкоцитів внаслідок порушення процесів сіалювання в умовах імунідепресії. Можливо припустити, що це є реакцією "приспосовання" системи крові до функціонування в умовах онкопроцесу, що розвивається.

На процеси нормального диференціювання та функціонування клітин, на нашу думку, впливають не тільки факти порушення кількості тих чи інших форм олігосахаридів, але і їхнє співвідношення, яке, за нашими даними, порушується вже на стадії аденоми ШЗ. Підтвердження цього є дослідження групи російських авторів (Морозевич Г.Е. та співавт., 2004), проведених на

лінії онкотрансформованих фібробластних клітин, які вказали на існування кореляції між метастатичною активністю фібробластів, їх інвазивними властивостями та рівнем експресії і характером мембранної дислокації адгезивних рецепторів (інтегринів).

#### **Висновки**

1. У хворих на аденому щитоподібної залози відбувається порушення процесів сіалювання кінцевих залишків D-галактози у складі поверхневих глікокон'югатів еритроцитів, гранулярних та агранулярних лейкоцитів.

2. Найбільш виразні зміни структури

глікокон'югатів у хворих на аденому щитоподібної залози спостерігаються в агранулярних, а у хворих на рак – і в гранулярних лейкоцитах.

3. У хворих на аденому та рак щитоподібної залози спостерігається зміни співвідношення сульфатованих та сіалюваних поверхневих олігосахаридів еритроцитів та лейкоцитів.

**Перспективи подальших досліджень** містяться у вивченні характеристик поверхні клітин крові, а саме вуглеводного компоненту поверхневих глікокон'югатів у хворих на аденому та рак щитоподібної залози за допомогою лектиногістохімії та протокової цитофлуориметрії.

#### **Літературні джерела**

Берман А.Е., Козлова Н.И., Морозевич Г.Е. Структура и сигнальные функции интегринов // Биохимия.- 2003.- Т.68, №12.- С.1597-1615.

Экспрессия интегринов и их роль в инвазивной активности онкотрансформированных фибробластов, различающихся по спонтанному метастазированию / Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Чубукина А.Н. и др. // Биохимия.- 2004.- Т.69, №6.- С.817-827.

Balsoni G., Spanguolo R., Dejana E. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells // Vasc. Biol.- 2000.- Vol.27.- P.1443-1451.

Bilyu R., Stoika R. Lectinocytochemical detection of apoptotic Murine leukemia L1210 cells // Cytometry.- 2003.- Vol.89.- P.89-95.

High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies / Lemamy G., Roger P., Mani J. et al. // Int. J. Cancer.- 1999.- Vol.80, №6.- P.896-902.

Impaired responses of leukemic dendritic cells derived from a human myeloid cell line to LPS stimulation / Kim K., Choi S., Noh Y. et al. // Exp. Mol. Med.- 2006.-Vol.38, №1.- P.72-84.

The glycosaminoglycan-binding domain of decoy receptor 3 is essential for induction of monocyte adhesion / Chang Y., Chan Y., Jackson D. et al. // J. Immunol.- 2006.- Vol.176, №1.- P.173-80.

#### **Хижняк А.М., Стеклєнева Н.И. Характеристика поверхностных гликокон'югатов клеток крови при заболеваниях на аденому и рак щитовидной железы.**

**Резюме.** В работе проведен анализ структуры поверхностных гликокон'югатов клеток крови у больных на аденому и рак щитовидной железы. Были исследованы пациенты возрастом от 35 до 50 лет, разделенные на три группы: 1. Группа больных на аденому щитовидной железы; 2. Группа больных на рак щитовидной железы; 3. Пациенты без патологии щитовидной железы. Мазки крови окрашивали альциановым синим с целью визуализации поверхностных гликокон'югатов, в состав которых входят сульфатные группы и сиаловая кислота, а также проводили десалирование мембран путем обработки нейраминидазой для определения соотношения сульфатированных и сиалированных олигосахаридов. Изучена характеристика распределения гистохимически-положительных участков на мембранах клеток, а также их количественная характеристика. Проведен сравнительный анализ структурных особенностей гликокон'югатов мембран разных клеток крови у больных на аденому и рак щитовидной железы, а также изучены указанные характеристики в норме. Установлено, что у больных на аденому и рак щитовидной железы наблюдается снижения количества сиалированных конечных остатков D-галактозы на поверхности эритроцитов, лейкоцитов, а также изменение соотношения сульфатированных и сиалированных остатков олигосахаридов в составе рецепторных комплексов указанных клеток.

**Ключевые слова:** поверхностные гликокон'югаты, щитовидная железа, рак, аденома, клетки крови.