

Г. С. Маслак¹, О. В. Костюк¹, Г. О. Кулініч¹, Н. С. Паша², О. З. Бразалук¹
 ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ¹
 МІСЬКА БАГАТОПРОФІЛЬНА КЛІНІЧНА ЛІКАРНЯ № 4²

ЕКСПОНУВАННЯ ФІБРОНЕКТИНУ ТА АЛЬФА-1-КИСЛОГО ГЛІКОПРОТЕЇНУ НА ПОВЕРХНІ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ЛЕЙКОЗ

Вивчали рівень α_1 -кислого глікопротеїну (АГП) та фібронектину (ФН) у плазмі крові, а також розподіл популяцій лейкоцитів за наявністю цих глікопротеїнів та їх щільність на поверхні клітин крові при гострому лейкозі. В роботі показано, що при гострому лейкозі протилежно змінюється розподіл АГП та ФН на поверхні лейкоцитів: щільність АГП зростає, а фібронектину, навпаки, зменшується. При цьому кількість моноцитів та гранулоцитів, що мають на своїй поверхні ці білки, знижується майже наполовину, а рівень лімфоцитів з АГП та ФН зростає майже на 30 %. Отримані результати можуть бути використані як діагностичний маркер гострого лейкозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: α_1 -кислий глікопротеїн, фібронектин, лейкоцити, гострий лейкоз, проточна цитометрія.

ВСТУП. Фібронектин (ФН) та альфа-1-кислий глікопротеїн (АГП) є глікопротеїнами, що визначаються в розчинній формі майже у всіх біологічних рідинах. Відомо, що клітини різних тканин, в тому числі й кровоносної системи, мають на своїй поверхні ФН та АГП у нормі [4, 5]. За допомогою *in vitro* експериментів доведено, що стимулювання різними факторами може активувати експонування цих білків на поверхні клітин крові. Так, виділені Т- і В-лімфоцити експресують АГП на своїй поверхні після РНА-Л-стимулювання [6], а активовані Т-лімфоцити експресують ФН на своїй поверхні за нормальних умов та можуть спонтанно зв'язувати цей білок з розчину [1]. Одночасно особливу цікавість можуть викликати дослідження АГП та ФН на поверхні клітин крові при онкопроліферативних захворюваннях, таких, як гострі лейкози.

Метою даної роботи було дослідити розподіл клітин, що мають на своїй поверхні ФН та АГП, і щільність експонування цих білків на лейкоцитах крові в нормі та при гострому лейкозі (ГЛ).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Рівень клітин, що мають АГП та ФН, визначали у здорових донорів (n=12) та хворих на ГЛ (n=10) методом © Г. С. Маслак, О. В. Костюк, Г. О. Кулініч, Н. С. Паша, О. З. Бразалук, 2011.

проточної цитофлуориметрії з використанням поліклональних антитіл до АГП (Life Span Biosciences, USA) та вторинних антитіл, мічених фікоеритрином (Santa Cruz, USA), а також моноклональних антитіл до матриксного ФН (AbD Serotec, UK) та відповідних антитіл до імуноглобулінів миші, що кон'юговані з флуоресцеїн-ізотіоціанатом (Millipore, USA). Обробку результатів проводили за допомогою програми "FCS3-Express". Рівень АГП та ФН визначали в плазмі крові методом імунодоту з використанням поліклональних кролячих антитіл до ФН та АГП і подальшою обробкою за допомогою програми "GelProAnalyser 32". Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми "Statistics 6.0".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження кількості клітин крові, що мають на поверхні АГП або ФН при ГЛ, показало зниження рівня моноцитів та гранулоцитів, що експонують АГП та ФН, майже у 2 рази. Кількість лімфоцитів, що мають на своїй поверхні АГП, зростала на 32 %, а фібронектину – на 27 % порівняно з нормою (рис. 1).

Щільність експонування ФН на всіх досліджуваних клітинах зменшувалась при ГЛ порівняно з нормою. Причому на лімфоцитах цей показник знижувався на 53 %, на моноцитах – на 45 %, а на гранулоцитах – на 26 %.

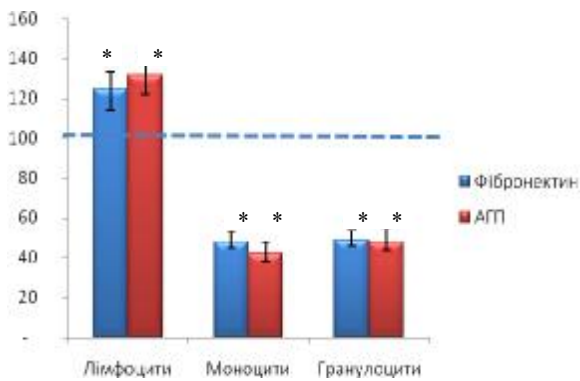


Рис. 1. Кількість лейкоцитів крові (у % відносно норми) при гострому лейкозі.

Примітка. Штрихованою лінією вказані нормальні значення; * – вірогідна різниця порівняно з контролем при $p < 0,05$.

Рівень АГП, навпаки, значно зростає: на лімфоцитах – на 66 %, на моноцитах – майже вдвічі, на гранулоцитах підвищувався майже в 2,5 раза. Результати наведено на гістограмах рисунка 2, що отримані за допомогою програми "FCS3-Express".

Концентрація АГП та ФН у плазмі крові в нормі складала $(0,842 \pm 0,039)$ та $(0,325 \pm 0,015)$ г/л відповідно. У хворих на ГЛ концентрація цих глікопротеїнів дорівнювала $(1,9 \pm 0,152)$ та $(0,333 \pm 0,019)$ г/л.

Відомо, що фібрoneктин може впливати на проліферацію Т-клітин та регулювати їх фагоцитарну активність [1]. Нами виявлено достовірне зменшення щільності експонування даного білка на поверхні всіх досліджуваних клітин на фоні нормального плазматичного рівня. З одного боку, це може бути пов'язано зі зниженням експресії гена ФН. Так, наприклад, при дослідженні експресуючої здатності дендритних клітин, виділених з крові хворих на гостру мієлоїдну лейкемію, було встановлено значне підвищення експресії фібрoneктину цими клітинами [1]. Тому більш вірогідною може бути думка, що зменшення кількості ФН на поверхні клітин крові при ГЛ може бути пов'язане зі зниженням зв'язування його клітинними рецепторами із плазми крові внаслідок зміни структури даних рецепторів або структури самого фібрoneктину (зміни глікозильованості, розщеплення на фрагменти). Так, відомим є той факт, що зміни сільованості ФН та його $\beta 1$ інтегринового рецептора призводять до порушення їх взаємодії [5].

АГП – протизапальний імуномодельючий агент, що пригнічує активацію поліморфноядерних нейтрофілів та модулює секреторну функцію моноцитів, а також впливає на їх

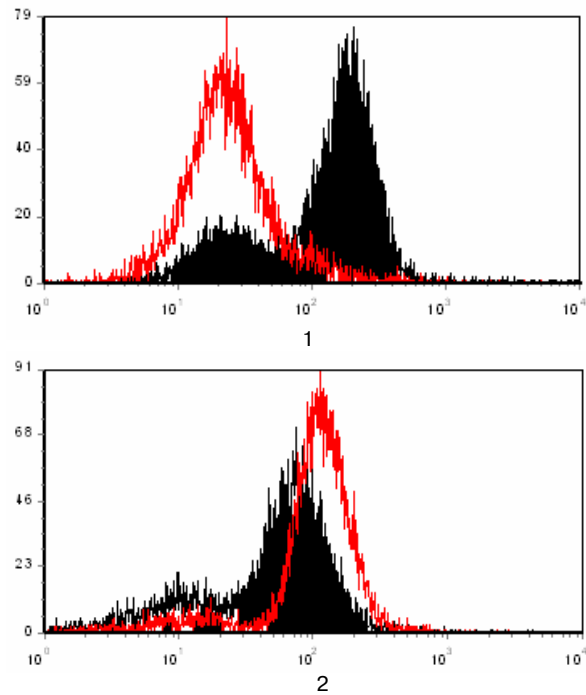


Рис. 2. Цитометричний аналіз експонування АГП та ФН на лейкоцитах крові в нормі (заштрихована площа) та при гострому лейкозі.

Примітка. 1 – інтенсивність флуоресценції для АГП; 2 – інтенсивність флуоресценції для ФН.

апоптоз [2]. При ГЛ його рівень підвищувався як у плазмі, так і на поверхні всіх досліджуваних клітин: лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, що, можливо, пов'язано з підвищенням його експресії при ГЛ. Так, на думку IL-NA Lee et al., зростання рівня експресії АГП є наслідком порушення диференціації мієлоїдних клітин, а введення терапевтичних агентів, що зменшують експресію гена АГП при гострій промієлоцитній лейкемії, призводить до зниження процесів диференціювання [3].

Таким чином, нами показано, що при ГЛ протилежно змінюється експонування АГП та ФН на фоні майже однакового розподілу клітин, що їх експонують. Отримані дані можуть бути використані як діагностичний маркер даного захворювання.

ВИСНОВКИ. 1. При ГЛ знижувалась кількість моноцитів та гранулоцитів, що експонували АГП і ФН, майже наполовину.

2. При ГЛ кількість лімфоцитів, що мають на своїй поверхні АГП, зростала на 32 %, а фібрoneктину – на 27 % порівняно з нормою.

3. Щільність експонування ФН на всіх клітинах зменшувалась при ГЛ порівняно з нормою, а АГП, навпаки, значно збільшувалась.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Abundant expression of fibronectin is a major feature of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia / A. Vialle-Castellano, B. Gaugler, M. Mohty [et al.] // *Leukemia*. – 2004. – **18**. – P. 426–433.
2. Alpha-1-acid glycoprotein inhibits phorbol ester-induced but not Fc-receptor-induced generation of reactive oxygen species in bovine peripheral blood neutrophils / R. Stakauskas, W. Leibold, J. Pieskus [et al.] // *Journal of Veterinary Medicine Series*. – 2005. – **52**. – P. 213–218.
3. IL-1 α Lee. Expression of α 1-Acid glycoprotein and inflammatory cytokines during differentiation of HL-60 Cells / IL-Ha Lee, In-Sook Kim, Soo-Young Lee // *J. of Biochemistry and Molecular Biology*. – 2000. – **33**, № 5. – P. 402–406.
4. Levander L. Effects of α 1-acid glycoprotein on polymorphonuclear leukocytes involvement of cell surface receptors / L. Levander // *Linkoping University Medical Dissertations*. – 2009. – № 1139.
5. Pan D. Role of altered sialylation of the I-like domain of β 1 integrin in the binding of fibronectin to β 1 integrin: thermodynamics and conformational analyses / D. Pan, Y. Song // *Biophys. J.* – 2010. – № 99. – P. 208–217.
6. The class II tumor-suppressor gene RARRES3 is expressed in B cell lymphocytic leukemias and down-regulated with disease progression / B. Casanova, M. T. Fuente, M. Garcia-Gila [et al.] // *Original Manuscript*. – 2001. – **15**, № 10. – P. 1521–1526.

А. С. Маслак¹, О. В. Костюк¹, А. А. Кулинич¹, Н. С. Паша², А. З. Бразалук¹
ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ¹
ГОРОДСКАЯ МНОГОПРОФИЛЬНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА № 4²

ЭКСПОНИРОВАНИЕ ФИБРОНЕКТИНА И АЛЬФА-1-КИСЛОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА ПОВЕРХНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Резюме

Изучали уровень α_1 -кислого гликопротеина (АГП) и фибронектина (ФН) в плазме крови, а также распределение популяций лейкоцитов по наличию этих гликопротеинов и их плотность на поверхности клеток крови при остром лейкозе. В работе показано, что при остром лейкозе противоположно изменяется распределение АГП и ФН на поверхности лейкоцитов: плотность АГП возрастает, а ФН – уменьшается. При этом количество моноцитов и гранулоцитов, имеющих на своей поверхности эти белки, снижается почти наполовину, а уровень лимфоцитов с АГП и ФН возрастает на 30 %. Эти данные могут быть использованы в качестве диагностического маркера острого лейкоза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: α_1 -кислый гликопротеин, фибронектин, лейкоциты, острый лейкоз, проточная цитометрия.

H. S. Maslak¹, O. V. Kostyuk¹, H. O. Kulinich¹, N. S. Pasha², O. Z. Brazaluk¹
DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY¹
CITY MULTIDISCIPLINARY CLINICAL HOSPITAL № 4²

EXPONATION OF FIBRONECTIN AND ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN ON THE SURFACE OF LEUKOCYTES OF BLOOD IN PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

Summary

Concentration of α_1 -acid glycoprotein (AGP) and fibronectin (FN) in plasma, the distribution of leukocytes populations in the presence of these glycoproteins and their density on the surface of white blood cells in acute leukemia were studied. Opposite changes of AGP and FN distribution on the surface of white blood cells were shown: density of AGP increased and FN reduced. The number of monocytes and granulocytes bearing on the surface of these proteins was reduced by nearly half, while the level of lymphocytes having AGP and FN increases by 30 %. Obtained results can be used as a diagnostic marker of acute leukemia.

KEY WORDS: α_1 -acid glycoprotein, fibronectin, leukocytes, acute leukemia, flow cytometry.

Отримано 05.10.11

Адреса для листування: О. З. Бразалук, Дніпропетровська державна медична академія, вул. Дзержинського, 9, Дніпропетровськ, 49044, Україна.