

ЕКСПОНУВАННЯ α 1,2-ФУКОАНТИГЕНІВ НА ЛІМФОЦИТАХ ХВОРИХ НА ІСТИННУ ПОЛІЦИТЕМІЮ ТА СУБЛЕЙКЕМІЧНИЙ МІЄЛОЗ

Досліджували експонування α 1,2-фукозильованих глікополів на поверхні лімфоцитів у гематологічно здорових донорів та хворих на істинну поліцитемію, сублейкемічний мієлоз. Локалізацію глікополів визначали методом проточної цитометрії з використанням лектинів кори золотого дощу звичайного – LАВА та дроку англійського – UEA I, кон'югованих із флуоресцентними мітками. Кількість лімфоцитів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, при сублейкемічному мієлозі та еритремії значно зростала ($p < 0,01$) порівняно з контрольною групою та складала (12,09±2,0) і (19,02±2,8) % відповідно. Водночас із кон'югатами ФІТЦ-ЛАВА зв'язувалося (2,02±0,30) і (11,0±1,04) % лімфоцитів хворих на сублейкемічний мієлоз та еритремію відповідно. Було відзначено їх значне і достовірне підвищення ($p < 0,01$) при досліджуваних лейкозах. При сублейкемічному мієлозі інтенсивність експонування фукоантигенів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів зростала вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів. Разом із тим, інтенсивність експонування ЛАВА-зв'язувальних антигенів не змінювалась в обох досліджуваних групах порівняно з контрольною групою. Використання лектину UEA I в проточній цитометрії може бути додатковим критерієм для диференціації цих захворювань на тих стадіях, коли їх клінічні прояви дуже подібні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: α 1,2-фукозильованість, лектини, лімфоцити, істинна поліцитемія, сублейкемічний мієлоз.

ВСТУП. Істинна поліцитемія (еритремія) є хронічним мієлопроліферативним захворюванням, доброякісним лейкозом, який характеризується підвищеним утворенням еритроцитів, нейтрофільних лейкоцитів і тромбоцитів. Часто симптоми захворювання з'являються лише на II стадії, що значно ускладнює своєчасну діагностику та лікування хворих. Крім того, симптоматичні ознаки істинної поліцитемії можуть бути ознакою інших захворювань. Одним із найбільш розповсюджених захворювань і тих, що мають спільну клінічну картину з еритремією, є сублейкемічний мієлоз – хронічний мієлолейкоз із клональною проліферацією кровотворних клітин. Характерною ознакою сублейкемічного мієлозу в термінальних стадіях є інтенсивна реакція стромы кісткового мозку, яка призводить до розвитку колагенового фіброзу [4].

Оскільки ці лейкози є так званими “liquid cancer”, дослідження клітин кровотоку з метою своєчасної діагностики та оцінювання стадії захворювання набуває великого значення, а використання методу проточної цитометрії є логічним і найбільш прийнятним інструментом для виконання такого завдання. Доведено, що © Г. С. Маслак, 2014.

при еритремії або сублейкемічному мієлозі мутацію JAK2 V617F гена відзначають не тільки в клітинах-попередниках лімфомієлоїдного ростка, але й у клітинах, що циркулюють у периферичній крові, в тому числі у лімфоцитах. Виявлення цього типу мутації майже завжди супроводжується ідентифікацією CD34+ антигенів на поверхні лімфоцитів, особливо Т-клітинної фракції [11]. Оскільки дані характеристики є загальними для обох типів мієлолейкозів, питання їх диференціювання залишається актуальним.

До фукоантигенів належать вуглеводні детермінанти на поверхні мембран клітин із термінальною або короною L-фукозою N- чи O-гліканів [13]. α 1,2-зв'язане термінальне фукозилювання спостерігають у складі Lewis антигенів (Le^x- та Le^y), які відсутні на клітинах здорової людини, але інтенсивно експонуються на їх поверхні за умов пухлинного росту. Такий тип фукозилювання на поверхні клітин змінює їх функції, прискорює процеси міграції клітин та метастазування і часто є поганим прогнозом для хворого [16].

Дослідження фукозильованості поверхневих глікокон'югатів в основному стосувалося поліпатентних клітин при мієлопроліферативних

захворюваннях та мало певні проблеми, оскільки потребувало додаткових процедур для отримання аспірату кісткового мозку [12]. Тому більш доступними та інформативними можуть бути дослідження методом проточної цитометрії клітин кровотоку, таких, як, наприклад, лімфоцити. За попередніми даними нашої лабораторії, поверхня цих клітин зазнає змін за умов мієлопроліферативних захворювань [2, 3]. Отже, метою роботи було дослідити $\alpha 1,2$ -фукозилзовані глікотопи на поверхні лімфоцитів хворих на істинну поліцитемію та сублейкемічний мієлоз.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження були лімфоцити крові хворих на істинну поліцитемію на стадії IIb із вираженим синдромом гіперв'язкості крові ($n=8$) та сублейкемічний мієлоз ($n=8$) віком 58–66 років. Контрольну групу становили гематологічно здорові волонтери ($n=10$) віком від 55 до 65 років.

Клінічне обстеження пацієнтів проводили згідно із стандартами медичної допомоги в умовах спеціалізованого стаціонару – гематологічного відділення комунального закладу “Міська багатопрофільна клінічна лікарня № 4” (м. Дніпропетровськ). Усі обстежувані в письмовому вигляді давали згоду на участь у дослідженні.

Лімфоцити виділяли з гепаринізованої крові (20–25 ОД гепарину на 1 мл крові) за модифікованим методом А. Воуп (1976), який оснований на седиментації клітин в градієнті густини фікол-урографіну ($\rho=1,077$ г/мл) [1]. Для цього в центрифужну пластикову пробірку наливали 2–3 мл градієнта густини, на нього нашарували 4–6 мл відстояної та попередньо розведеної вдвічі у фізіологічному розчині плазми і верхній шар еритроцитів. Пробірки центрифугували впродовж 40 хв із прискоренням 200 g за кімнатної температури. Інтерфазне кільце з лімфоцитів відбирали в суху конічну центрифужну пробірку. Отриману суспензію клітин двічі відмивали в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) таким чином: до суспензії лімфоцитів додавали 3–4 мл ЗФР, вміст пробірки ретельно перемішували і центрифугували з прискоренням 200–300 g за кімнатної температури, потім рідину над осадом відбирали. Після відмивання клітини ресуспендували в ЗФР, підраховували їх кількість у камері Горяєва. Життєздатність клітин (понад 90 %) визначали за допомогою триптанового синього (Д. К. Новиков, В. И. Новикова, 1996), готували робочу концентрацію лімфоцитів (300 тис./мл у кожному зразку) [7]. Фукозилзовані глікотопи визначали методом проточної цитофлуори-

метрії з використанням лектину кори золотого дощу звичайного – LABA – *Laburnum anagyroides lectin* (Лектинотест, Україна) та лектину дроку англійського – UEA I – *Ulex europaeus agglutinin* (EU Laboratories, Switzerland), кон'югованих із флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ). Кількість мертвих клітин контролювали за їх зв'язуванням із пропідій йодидом. Реєстрацію даних проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS. Обробку результатів здійснювали за допомогою програми FC Express.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Statistics 6.0. Достовірність відмінностей у групах порівняння встановлювали з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження експонування фукоантигенів на поверхні лімфоцитів проводили, використовуючи фукозоспецифічні аглютиніни рослинного походження: лектин кори золотого дощу звичайного – LABA та лектин дроку англійського – UEA I. За даними V. E. Piskarev (2007), застосування цих лектинів може відображати наявність $\alpha 1,2$ -фукозилзованих антигенів [13], оскільки вони мають найбільшу спорідненість до послідовності $Fuc\alpha(1,2)Gal\beta 1-R$.

Дослідження лімфоцитів із поверхневими фукоантигенами в гематологічно здорових донорів показали їх незначну кількість: $(2,9\pm 0,2)$ % за зв'язуванням з UEA I та $(0,9\pm 0,1)$ % – з LABA (рис. 1). Разом із тим, за умов сублейкемічного мієлозу та еритремії ці показники значно зростали ($p<0,01$). Кількість лімфоцитів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, складала $(12,09\pm 2,0)$ і $(19,02\pm 2,8)$ % при субмієлозі та еритремії відповідно. Водночас із, кон'югатами ФІТЦ-LABA зв'язувалося лише $(2,02\pm 0,30)$ і $(11,0\pm 1,04)$ % лімфоцитів хворих на сублейкемічний мієлоз та еритремію відповідно.

Дослідження інтенсивності експонування фукоантигенів, що взаємодіяли з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів показали їх значне і достовірне підвищення ($p<0,01$) при досліджуваних лейкозах. При сублейкемічному мієлозі цей показник зростав вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів (рис. 2, А). Разом із тим, інтенсивність експонування LABA-зв'язувальних антигенів не змінювалась в обох досліджуваних групах порівняно з контрольною групою (рис. 2, В).

Згідно з отриманими результатами, при мієлопроліферативних захворюваннях визначається перерозподіл лімфоцитів крові за експонуванням на них фукоантигенів порівняно з

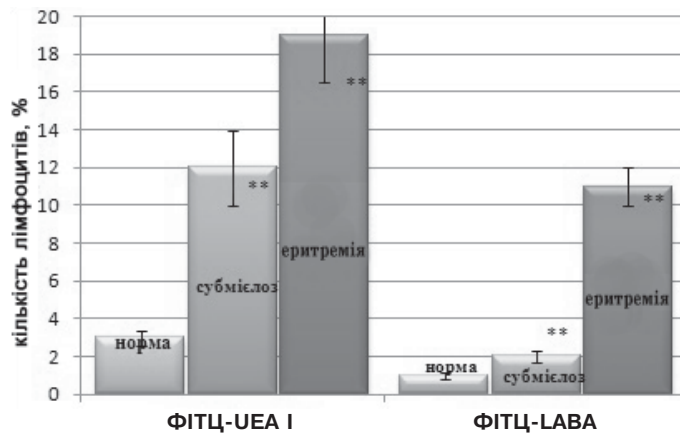


Рис. 1. Кількість лімфоцитів крові хворих на сублейкемічний мієлоз і еритремію та гематологічно здорових донорів із поверхневою локалізацією фукоантигенів, виявлених за допомогою мічених флуоресцеїнізотіоціанатом (ФІТЦ) лектину кори золотого дощу звичайного – LABA та лектину дроку англійського – UEA I (* – вірогідна різниця порівняно з контрольною групою норми при $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$).

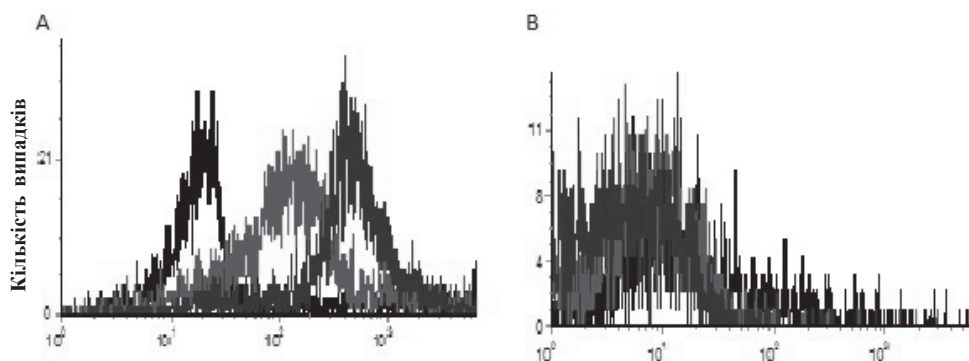


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції ФІТЦ-UEA I (А) і ФІТЦ-LABA (В) на лімфоцитах гематологічно здорового донора (чорна лінія), хворого на сублейкемічний мієлоз (червона лінія) і хворого на еритремію (синя лінія) за даними проточної цитометрії на Beckman Coulter EPICS.

групою гематологічно здорових донорів. Значно зростає не тільки кількість клітин, що зв'язуються з фукозоспецифічними лектинами, але й інтенсивність експонування фукоантигенів на їх поверхні. Слід звернути увагу на різні результати у хворих на еритремію та субмієлоз щодо як кількості клітин, так і інтенсивності їх зв'язування з фукозоспецифічними лектинами. Найбільшу різницю за цими параметрами було отримано при використанні лектину UEA I. Його пухлиноспецифічність доведено при генітоуринарних та ендометріальних карциномах, раку легенів [9]. Також робили спроби використати даний лектин у діагностичному напрямку при мієлопроліферативних захворюваннях. S. Y. Yoon та ін. на біопсійних мазках мегакаріоцитів спинного мозку хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання показали не тільки різний ступінь зв'язування UEA I порівняно зі здоровими донорами, але й залежність інтенсивності взаємодії цього лектину від впливу анагреліду – препарату, який призначають таким хворим для контролю процесів тромбоцитозу [8]. Однак подальші дослідження в цьому напрямку довели більшу ефективність

використання UEA I разом із додатковим маркером – фактором Віллебранда [10].

Перерозподіл глікокон'югатів із $\alpha 1,2$ -фукозильованими детермінантами при мієлопроліферативних захворюваннях тісно пов'язаний з експресією та активністю ензиму посттрансляційної модифікації – $\alpha 1,2$ -фукозилтрансферази, яка транспортує фукозу на попередник лактозамінового типу [7]. S. Mathieu та ін. показали, що експресія $\alpha 1,2$ -фукозилтрансферази селективно гальмує синтез sialyl-Lewis антигенів на різних клітинах, у тому числі й лейкоцитах, та призводить до порушень взаємодії таких клітин та розповсюдження метастазів [14]. Можливо, такі самі процеси супроводжують перебіг мієлопроліферативних лейкозів, які було досліджено. Крім того, важливе значення мають CD-антигени, які з'являються при розвитку цих захворювань. CD34+ синтезується практично на всіх клітинах крові та є мікрогетерогенним білком, модифікації якого, в тому числі й ступеня фукозилювання, призводять до порушень процесів міжклітинної взаємодії при пухлинних процесах [15]. За даними B. Andreasson, завдяки різному ступеню експонування

CD34+ антигену можна розрізнити еритремію, тромбоцитемію та мієлофіброз, який є проявом сублейкемічного мієлозу [6]. Отже, можливо, зміни α 1,2-фукозилування, отримані нами за допомогою проточної цитометрії, пов'язані саме з порушенням процесів посттрансляційної модифікації глікопротеїнів, синтез яких прискорюється при мієлопроліферативних захворюваннях.

Глікокон'югати клітинної поверхні мають фундаментальне значення в різноманітних біологічних процесах, таких, як міжклітинна взаємодія, адгезія, мембранна організація та клітинна імуногенність, а модифікація їх структури призводить до зміни функціонування клітини. Тому пов'язане з хворобою порушення глікозилуваності має великий потенціал як джерело пухлиноасоційованих маркерів для модуляції імунної відповіді та визначення поведінки пухлини [5]. Отримані в роботі результати можуть бути корисними для розуміння глікобіологічних процесів перебігу еритремії та сублейкемічного мієлозу, викорис-

тання лектину UEA I в проточній цитометрії може бути додатковим критерієм для диференціації цих захворювань на тих стадіях, коли їх клінічні прояви дуже подібні.

ВИСНОВКИ. 1. Кількість лімфоцитів із фукоантигенами, які взаємодіють з ФІТЦ-LABA, зростає, порівняно з групою гематологічно здорових донорів, удвічі та вдесятеро при сублейкемічному мієлозі й еритремії відповідно.

2. Рівень клітин, які взаємодіють з UEA I, також підвищується, порівняно з групою контролю, при субмієлозі та еритремії в 4 і майже 7 разів відповідно.

3. При сублейкемічному мієлозі інтенсивність експонування фукоантигенів, що взаємодіють з ФІТЦ-UEA I, на плазматичній мембрані лімфоцитів зростає вдесятеро, а при еритремії – в 100 разів.

4. Інтенсивність експонування LABA-зв'язувальних антигенів не змінюється в групах хворих на мієлопроліферативні захворювання порівняно з контрольною групою.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Иммунология: практикум : учеб. пособ. / под ред. Л. В. Ковальчука, Г. А. Игнатъевой, Л. В. Ганковской. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176 с.
2. Маслак А. С. Распределение гранулоцитов с поверхностными гликопротеинами в норме и при миелопролиферативных заболеваниях / А. С. Маслак // Актуальные проблемы биологии и медицины. – 1. – С. 29–31.
3. Маслак Г. С. Порівняльний аналіз лімфоцитів крові хворих на гострі та хронічні мієлолейкози за експонованими на поверхні внутрішньоклітинними глікопротеїнами / Г. С. Маслак // Біологічні Студії. – 2014. – 8, № 1. – С. 117–124.
4. Особенности структурной организации костного мозга при различных стадиях миелофиброза с миелоидной метаплазией / И. Н. Кабаченко, В. Г. Бебешко, А. Н. Грабовой [и др.] // Вісник морфології. – 2005. – № 2. – С. 164–168.
5. Adamczyk B. Glycans as cancer biomarkers / B. Adamczyk, T. Tharmalingam, P. M. Rudd // Biochim Biophys Acta. – 2012. – 20, № 9. – P. 1347–1353.
6. Andreasson B. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia / B. Andreasson, B. Swolin, J. Kutti // Eur. J. Haematol. – 2002. – 68, № 4. – P. 189–193.
7. Becker D. J. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals / D. J. Becker, J. B. Lowe // Glycobiology. – 2003. – 13, № 7. – P. 41–53.
8. Bone marrow effects of anagrelide therapy in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia / S. Y. Yoon, C. Y. Li, R. A. Mesa [et al.] // Br. J. Haematol. – 1999. – 106, № 3. – P. 682–688.
9. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas—An appraisal / F. S. Asma, M. Sameena, F. Khan [et al.] // Indian J. Clin. Biochem. – 2003. – 18, № 2. – P. 169–180.
10. Chuang S. S. von Willebrand factor is the most reliable immunohistochemical marker for megakaryocytes of myelodysplastic syndrome and chronic myeloproliferative disorders / S. S. Chuang, Y. C. Jung, C. Y. Li // Am. J. Clin. Pathol. – 2000. – 113, № 4. – P. 506–511.
11. Delhommeau F. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis / F. Delhommeau, S. Dupont, C. Tonetti // Blood. – 2007. – 109, № 1. – P. 71–77.
12. Fucose binding lectin for characterizing acute myeloid leukemia progenitor cells / R. Delwel, I. Touw, F. Bot [et al.] // Blood. – 1986. – 68, № 1. – P. 41–45.
13. Piskarev V. E. Interaction of the Laburnum anagyroides lectin with fucoantigens / V. E. Piskarev, T. L. Bushueva, I. A. Iamskov // Bioorg. Khim. – 2007. – 33, № 1. – P. 182–186.
14. Transgene expression of alpha(1,2)-fucosyltransferase-I (FUT1) in tumor cells selectively inhibits sialyl-Lewis x expression and binding to E-selectin without affecting synthesis of sialyl-Lewis a or binding to P-selectin

tin / S. Mathieu, M. Prorok, A. M. Benoliel [et al.] // Am. J. Pathol. – 2004. – 164, № 2. – P. 371–383.

15. Tuccillo F. M. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43 / F. M. Tuccillo, A. Laurentiis, C. Palmieri // BioMed. Research International. – 2014. – 742.

16. Zerfaoui M. $\alpha(1,2)$ -Fucosylation prevents sialyl Lewis x expression and E-selectin-mediated adhesion of fucosyltransferase VII-transfected cells / M. Zerfaoui, M. Fukuda, V. Sbarra // European Journal of Biochemistry. – 2001. – 267, № 1. – P. 53–61.

А. С. Маслак

ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

ЭКСПОНИРОВАНИЕ $\alpha(1,2)$ -ФУКОАНТИГЕНОВ НА ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ И СУБЛЕЙКЕМИЧЕСКИМ МИЕЛОЗОМ

Резюме

Исследовали экспонирование $\alpha(1,2)$ -фукозилированных гликотопов на поверхности лимфоцитов у гематологически здоровых доноров и больных истинной полицитемией, сублейкемическим миелозом. Локализацию гликотопов определяли методом проточной цитометрии с использованием лектинов коры золотого дождя обычного – LABA и дрока английского – UEA I, конъюгированных с флуоресцентными метками. Количество лимфоцитов, которые взаимодействовали с ФИТЦ-UEA I, при сублейкемическом миелозе и эритремии значительно возрастало ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой и составляло $(12,09 \pm 2,0)$ и $(19,02 \pm 2,8)$ % соответственно. В то же время с конъюгатами ФИТЦ-LABA связывалось $(2,02 \pm 0,30)$ и $(11,0 \pm 1,04)$ % лимфоцитов больных сублейкемическим миелозом и эритремией соответственно. Было отмечено их значительное и достоверное повышение ($p < 0,01$) при исследуемых лейкозах. При сублейкемическом миелозе интенсивность экспонирования фукоантигенов, которые взаимодействовали с ФИТЦ-UEA I, на плазматической мембране лимфоцитов возрастала в 10 раз, а при эритремии – в 100 раз. В то же время интенсивность экспонирования LABA-связывающих антигенов не изменялась в обеих исследуемых группах по сравнению с контрольной группой. Использование лектина UEA I в проточной цитометрии может быть дополнительным критерием для дифференциации этих заболеваний на тех стадиях, когда их клинические проявления очень сходны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: $\alpha(1,2)$ -фукозилированность, лектины, лимфоциты, истинная полицитемия, сублейкемический миелоз.

H. S. Maslak

DNIPROPETROVSK MEDICAL ACADEMY

$\alpha(1,2)$ -FUCOANTIGENS EXPONATION ON LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH POLYCYTHEMIA VERA AND SUBLEUKEMIC MIELOSIS

Summary

$\alpha(1,2)$ -fucosylated glycotopes exponation on the surface of lymphocytes from hematologically healthy donors and patients with polycythemia vera and subleukemic myelosis were investigated. Glycotopes localization was investigated by flow cytometry using lectins from the bark of Golden Rain shrub – LABA and lectin from gorse seeds – UEA I conjugated with fluorescent labels. The number of lymphocytes that interact with FITC-UEA I at subleukemic mieloses and polycythemia vera was significantly increased ($p < 0.01$) compared with the control group and was (12.09 ± 2.0) and (19.02 ± 2.8) %, respectively. An intensity of fukoantigens exponation that interact with FITC-UEA I on the plasma membrane of lymphocytes increased tenfold in subleukemic mieloses patients and in 100 times for polycythemia vera patients. At the same time exhibiting intensity of LABA- binding antigens not changed in both studied groups as compared with the control group. Using lectin UEA I in flow cytometry be effective criteria to differentiated these diseases on the stage when their clinical manifestations very similar.

KEY WORDS: $\alpha(1,2)$ -fucosylation, lectins, lymphocytes, polycythemia vera, subleukemic mieloses.

Отримано 25.03.14

Адреса для листування: Г. С. Маслак, Дніпропетровська медична академія, вул. Весела, 30 а, Дніпропетровськ, 49024, Україна.