

13. Показатель проницаемости эритроцитарных мембран в оценке функционального состояния организма / В.А. Мойсеенко, Л.И. Антоненко, Л.Л. Аршинников [и др.] // Крымский терапевтический журнал. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 103–107.

14. Потапенко А.Я. Осмотическая устойчивость эритроцитов : учебное пособие / А.Я. Потапенко, А.А. Кягова, А.М. Тихомиров. – ГОУ ВПО ГРМУ, 2006. – 16 с.

15. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / [под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой]. – К. : Выща школа, 1988. – 317 с.

16. Сяюхова Д.Б. Способы коррекции анемии у онкологических больных / Д.Б. Сяюхова, Л.Г. Бабичева // Вестник АГУ. – 2016. – Т. 186, № 3. – С. 61–66.

17. A Case of Non-Hodgkin's Lymphoma in Patient with Coomb's Negative Hemolytic Anemia and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura / S.Y. Park, S. Kim, E.S. Kim [et al.] // Cancer Res Treat. – 2012. – V. 44, № 1. – P. 69–72.

18. Johnson S.T. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia – a new paradigm / S.T. Johnson, J.T. Fueger, J.L. Gottschall // Transfusion. – 2007. – Vol. 47, № 4. – P. 697–702.

Надійшла 21.09.2017 року.

УДК 547.963.1+616-097]: 616.155.392.2

ЕКСПРЕСІЯ CD38 І ВУГЛЕВОДНІ ДЕТЕРМІНАНТИ ЛЕЙКЕМІЧНИХ В-ЛІМФОЦИТІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ЛІМФОЦИТАРНІЙ ЛЕЙКЕМІЇ

**О.О. Шалай, Г.Б. Лебедь, В.А. Барілка,
Я.І. Виговська, Н.Я. Томашевська, В.Є. Логінський**

*ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України»,
Львів*

Резюме. Досліджено вуглеводні детермінанти мембран лейкемічних лімфоцитів за допомогою 12 лектинів основних груп вуглеводної специфічності у 65 хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ). Проведено визначення взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену. Встановлено, що підвищення експресії CD38 супроводжується збільшенням числа клітин, на поверхні яких містяться антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA) та глікозидні залишки антигену А (лектин SBA), властиві для O-гліканів, термінальна Fіса (лектин LAL) та знижується рівень сіалізованих поліантених N-гліканів з ланцюгам комплексного (I і II) і гібридного типу (RCA, PHA-L, WGA, STL).

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, В-лімфоцити, CD38, лектини, вуглеводні детермінанти

EXPRESSION OF CD38 AND CARBOHYDRATE DETERMINANTS ON LEUKEMIC B-LYMPHOCYTE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

O.O. Shalay, G.B. Lebed, V.A. Barilka, Y.I. Vygovska,
N.Y. Tomashevskaya, V.E. Loginsky

SI «Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine of NAMS of Ukraine», Lviv

Resume. Carbohydrate determinants of leukemic lymphocyte membrane were studied in 65 patients suffering from chronic lymphocytic leukemia (CLL) using panel of 12 lectins with main carbohydrate specificity. The interconnection between the level of expression lectin receptors and CD 38 antigen was determined. It has been found that the higher CD 38 expression level is accompanied with an increased number of cells the surface of which contains Thomsen-Friedenreich antigen (PNA lectin) and glycosidic remains of A antigen (SBA lectin), peculiar to N-glycans, terminal Fuca (LAL lectin) and a decreased level of cialysed polyantanna N-glycans with complex-type chains (I and II) and hybrid-type chains (RCA, PHA-L, WGA, STL).

Key words: chronic lymphocytic leukemia, B-lymphocytes, CD38, lectins, carbohydrate determinants

Вступ. Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) найчастіша форма лейкемії в Європі, представляє собою В-клітинну проліферацію з характерним фенотипом пухлинних лімфоцитів $CD5^+CD19^+CD23^+$, з клінічно гетерогенним перебігом. [5].

Дослідники постійно ведуть пошук таких фенотипових ознак лейкемічних лімфоцитів (поверхневих клітинних маркерів, імунологічних, генетичних), які б визначали перебіг і прогноз при ХЛЛ і одночасно були б доступними для повсякденної діагностичної практики гематології [7]. Найбільшу увагу привертає антиген CD38. Показано, що його експресія на неопластичних лімфоцитах визначає клінічний перебіг та загальне виживання хворих на ХЛЛ [5, 7]. Обговорюється роль CD38 як сигнальної молекули у регуляції виживання лейкемічних клітин при ХЛЛ, зв'язок рівня її експонування з мутаційним статусом IgVH і геномними абераціями.

Поверхневі антигени лімфоїдних клітин, як білки мембрани, переважно представлені глікопротеїнами. Різноманітність глікопротеїнів мембрани (глікокод за Габіусом [4]) визначає фенотипові особливості різних за походженням клітин, забезпечує міжклітинну і внутрішньоклітинну передачу сигналів (інформації), які регулюють життєдіяльність клітини, та її взаємодію з іншими клітинами і мікрооточенням [6, 8]. Однак визначення фенотипу глікопротеїнів пухлинних клітин за допомогою «дешифраторів глікокоду» – лектинів мало поширене [1, 3]. Особливості поверхневих вуглеводних детермінант, яким належить важлива роль у міжклітинній

взаємодії [2, 3, 4, 8] і тим самим у здатності до поширення лейкемічних лімфоцитів при ХЛЛ, менше вивчені ніж CD антигени, а зв'язок між ними взагалі поза увагою дослідників.

Метою цієї роботи було визначення взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену залежно від характеру розподілу відсотка CD38-позитивних клітин у хворих на ХЛЛ.

Матеріали і методи. Вуглеводні компоненти лейкемічних клітин за допомогою лектинів і експресію CD38 досліджували у 65 хворих на В-ХЛЛ (45 чоловіків і 20 жінок) віком від 38 до 79 років. У двох випадках дослідження проводилось повторно у перебігу хвороби. Діагноз ХЛЛ встановлювали на підставі клініко-лабораторних досліджень відповідно до критеріїв Національного інституту раку (NCI), включно з цитологічним та імунофенотиповим дослідженням клітин периферичної крові і/або кісткового мозку [9]. У всіх хворих діагностовано типову В-клітинну ХЛЛ.

Відповідно до загальноприйнятих класифікацій стадій ХЛЛ за Rai та Binet обстежених хворих розподілено на групи. При стадіюванні за Rai виділено групу проміжного ризику – 21 хворий на В-ХЛЛ I–II стадії та групу високого ризику – 46 хворих III–IV стадії. Відповідно у 27 випадках діагностовано стадію A-B хвороби і у 40 випадках – стадію C за Binet.

У периферичній крові лімфоцитоз складав до 50% у 2, понад 50% у 65 випадках. Абсолютна кількість лімфоцитів периферичної крові становила у 4 пацієнтів до 10×10^9 /л, у 11 – $10\text{--}20 \times 10^9$ /л, понад 20×10^9 /л – у 51 хворого. Анемію (Hb <110 г/л) виявлено у 45 (67%) осіб, тромбоцитопенію ($<100 \times 10^9$ /л) у 30 (45%) хворих. У всіх випадках в пунктаті кісткового мозку спостерігали високий відсоток лімфоцитів (65–90%) з фенотипом $CD5^+CD19^+CD23^+$.

Нормальні показники профілю лектинових рецепторів і рівня експресії CD антигенів лімфоїдних клітин периферичної крові встановлено при дослідженні мононуклеарів крові у 15 здорових осіб (контрольна група) середнього віку (7 чоловіків та 8 жінок).

Мононуклеарні клітини периферичної крові виділяли у градієнті густини фікол-верографіну ($d=1,077$). Дослідження глікокон'югатів поверхневої мембрани пухлинних клітин периферичної крові і/або кісткового мозку хворих на ХЛЛ та у контрольній групі проводили за допомогою панелі з 12 лектинів, помічених пероксидазою (Лектинотест, Львів). В роботі використано лектини всіх основних груп вуглеводної специфічності: *D*-галактозоспецифічні (Gal) – аглютиніни арахісу (PNA), рицини (RCA), омели білої (ML-I); *N*-ацетил-*D*-галактозаміноспецифічні (GalNAc) – лектини виноградного слимака (HPL), сої (SBA); *D*-маннозоспецифічні (Man) лектини із насіння сочевиці харчової (LCL), гороху

(PSL); N-ацетил-*D*-глюкозаміноспецифічні (GlcNAc) лектини – аглютинін зародків пшениці (WGA), лектин бульб картоплі (STL); *L*-фукозо-специфічний (Fuc) лектин кори золотого дощу (LAL); сіалоспецифічний (N-ацетилнейрамінова кислота, NANA) лектин кори бузини чорної (SNL); поліспецифічний лектин із квасолі звичайної (PHA-L).

Рецептори лектинів визначали на десіалізованих нейрамінідазою клітинах за допомогою методики, описаної нами раніше [1]. Визначення лінійних, диференційних та активаційних CD антигенів лімфоцитів виконували непрямим імуофлюоресцентним методом, використовуючи моноклональні антитіла (МКАТ) до CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD38, CD95, HLA-Dr, κ , λ і μ ланцюгів Ig та як вторинні антитіла F(ab)₂ фрагменти МКАТ до Ig білої миші, помічені FITC, виробництва ІЕПОР (Київ, Україна), Dako (Данія).

Оцінку результатів фенотипування лектинових рецепторів і CD антигенів здійснювали шляхом підрахунку відсотку позитивного маркування на 200 клітин. Реакцію вважали позитивною, якщо з ним взаємодіяло >20% лімфоцитів.

Результати дослідження аналізували методами варіаційної статистики з обчисленням коефіцієнта Стьюдента (t) та з використанням формули Фішера для частотних показників (p_F). Взаємозалежність між показниками парних досліджень встановлювали за коефіцієнтом кореляції (r).

Результати та їх обговорення. Встановлено, що на моноклональних В-лімфоцитах хворих на ХЛЛ визначається доволі низька експресія більшості вивчених глікокон'югатів, порівняно з нормальними лімфоцитами у контрольній групі здорових осіб. Наші результати співпадають з даними літератури [3, 6], хоча деякі лектини (STL, SNL) раніше не використовувалися з цією метою.

На відміну від нормальних лімфоцитів, на яких антиген Томсена-Фріденрайха (PNA⁺) відсутній, у 27% хворих на лімфоцитах він був виявлений, що свідчить про наявність у їх мембрані O-гліканів, властивих незрілим та активованим клітинам. Істотно знижується на лейкоцитарних лімфоцитах рівень глікозидних ланцюгів I і II типу N-гліканів (RCA). Лімфоцити хворих на ХЛЛ вірогідно слабше реагували з GalNAc α -специфічним лектином SBA, Man α -специфічним лектином PSL та GlcNAc β -специфічними лектинами (WGA і STL), поліспецифічним лектином PHA. Дещо збільшується на них експресія залишків Fuc α (табл. 1).

Дослідження антигенного профілю лейкоцитарних лімфоцитів показали, що на їх мембрані експоновані типові для ХЛЛ CD маркери. У хворих дослідної групи 60–80% лімфоцитів взаємодіяли з МКАТ до CD5, CD19, CD20, CD21, CD23, HLA-Dr, sIgM, з перевагою одного із типів легких

ланцюгів Ig κ або λ низької густини (ознака їх моноклональності). Т-клітинні антигени (CD3, CD7, CD4, CD8) були представлені на мінорній популяції лімфоцитів (5-12%; залишкова популяція Т-клітин).

Ми провели дослідження взаємозв'язку між рівнем експресії рецепторів лектинів і CD38 антигену, який різною мірою представлений на лімфоцитах окремих хворих і має прогностичне значення.

Хворі були розділені на групи з низькою і підвищеною експресією цього антигену на основі характеру розподілу відсотка позитивних клітин в окремих випадках. Як видно з рисунка, для антигену CD38 порогова величина експресії для розмежування цих груп становила 30%.

Виявлено зміни структури глікопротеїнів мембрани лімфоцитів у хворих залежно від експресії CD38 (трансмембранного глікопротеїну з ензиматичною активністю, адгезивною і сигнальною функцією), важливого несприятливого прогностичного маркера лімфоцитів при ХЛЛ з підвищеною проліферативною активністю, який відображає мутації генів IgVH. Результати аналізу з урахуванням частоти випадків 1% позитивних клітин наведено у таблиці 1.

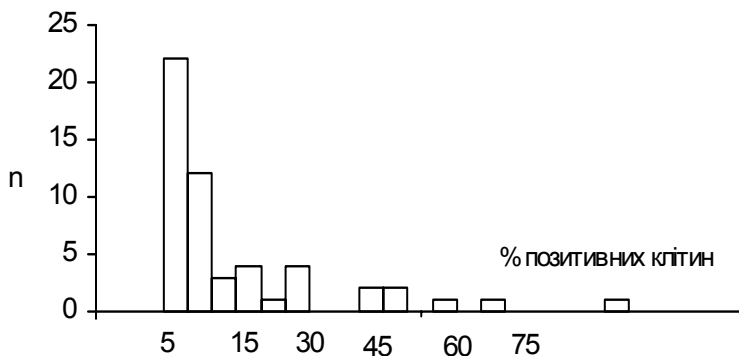


Рис. Графік частотного розподілу відсотка CD38⁺ лімфоцитів в окремих хворих на ХЛЛ

У групі хворих з низьким рівнем експресії CD38⁺ ≤30% не виявлено вірогідних змін рівня взаємодії з лектинами порівняно з загальною групою пацієнтів.

Лейкемічні лімфоцити з підвищеною експресією CD38 (>30% CD38⁺ клітин) виявляють істотно вищий рівень взаємодії з лектином PNA (антиген Т), який властивий для мембрани молодих і активованих лімфоцитів,

та знижений з RCA, на них більше термінальних залишків Fuc α (антиген H; лектин LAL).

Проведено кореляційний аналіз між відсотком лейкоцитів, що зв'язують лектини, та CD38⁺ лімфоцитів у загальній групі хворих, а також у пацієнтів з низьким і високим рівнем експресії CD38. У загальній групі хворих кореляційного зв'язку між цими величинами не знайдено (табл. 2).

Таблиця 1 – Рівень зв'язування лектинів з мембраною пухлинних лімфоцитів у хворих на ХЛЛ залежно від експресії CD38

Лектини	Специфічність	Контрольна група n=15	Група хворих n=67	CD38 ⁺ клітини	
				≤30% n=47	>30% n=7
PNA	Gal β	0/15 6,3±1,0	18/67 15,2±0,9*	11/47 14,4±1,1	4/7 19,3±1,9*
RCA	Gal β	15/15 68,5±3,9	52/61 32,7±1,4*	36/42 32,3±1,6	4/6 20,4±5,2*
ML-1	Gal α	2/15 14,3±1,8	16/61 18,3±1,1	11/42 17,8±1,2	1/6 20,8±2,2
HPL	GalNAc α	0/15 4,3±1,0	3/67 7,6±0,7*	1/47 7,4±2,2	0/7 7,4±2,2
SBA	GalNAc α	3/15 15,9±1,5	3/67 9,0±0,8*	2/47 8,2±0,9	0/7 8,3±1,2
LCL	Man α , Fuc α	4/15 10,9±1,9	15/67 12,0±1,1	11/47 12,2±1,3	2/7 11,2±3,6
PSL	Man α	13/15 40,4±2,8	32/61 22,0±1,1*	22/42 21,9±1,2	2/6 22,1±1,8
WGA	GlcNAc β	15/15 61,7±3,9	44/67 35,1±2,2*	33/47 35,9±2,5	5/7 42,7±7,8
STL	GlcNAc β	11/15 31,1±2,7	28/61 21,2±1,2*	20/42 21,9±1,4	2/6 16,6±3,2
LAL	Fuc α	0/15 9,1±1,2	14/67 14,4±1,1*	6/47 13,1±1,1	4/7 20,8±4,0*
SNL	NANA α	8/15 23,3±1,8	21/67 19,3±1,4	14/47 18,7±1,3	4/7 28,5±8,3
PHA-L	Поліспецифічний	15/15 81,3±2,9	50/61 36,1±1,5*	35/42 38,1±1,7	5/6 38,1±4,3

Примітки:

1. У колонках представлено співвідношення позитивних випадків (експресія маркера >20%) до числа випадків та середня кількість позитивно реагуючих клітин;

2. * відзначено показники, що вірогідно (p<0,05) відрізняються від аналогічного показника попередньої групи.

Аналогічно ми не відзначили взаємозалежності між глікопротеїновими структурами мембрани лейкоцитних лімфоцитів і кількістю CD38⁺ клітин у групі хворих з низьким рівнем експресії CD38 ($\leq 30\%$).

Високий рівень експресії CD38 ($>30\%$) корелює з підвищеним вмістом дисахариду антигену А (GalNAc α 1 \rightarrow 3Gal β ; лектин SBA), зниженням сіалізованих залишків GlcNAc β (лектин WGA, $r = -0,702$; лектин STL, $r = -0,503$) та сіалової кислоти (лектин SNL). На них менше поліантенних N-гліканів (лектин PNA-L, $r = -0,701$), про що свідчать дані таблиці 2.

Таблиця 2 – Кореляційна залежність між рівнем зв'язування лектинів та експресією CD38

Лектини	Специфічність	Заг. група <i>r</i>	CD38 ⁺ $\leq 30\%$ <i>r</i>	CD38 ⁺ $> 30\%$ <i>r</i>
PNA	Gal β	+0,264	+0,204	-0,220
RCA	Gal β	+0,023	+0,164	+0,141
ML-1	Gal α	+0,168	+0,152	-0,138
HPL	GalNAc α	+0,161	+0,330	+0,292
SBA	GalNAc α	+0,127	+0,231	+0,691*
LCL	Man α , Fuc α	+0,046	+0,188	+0,038
PSL	Man α	-0,106	-0,238	-0,328
WGA	GlcNAc β	+0,050	+0,050	-0,702**
STL	GlcNAc β	-0,270	-0,151	-0,503*
LAL	Fuc α	+0,333	+0,005	+0,517*
SNL	NANA α	+0,160	+0,068	-0,548*
PNA-L	Поліспецифічний	-0,108	-0,205	-0,701**

Примітки: * кореляція середньої сили ($0,5 \leq r < 0,7$); ** сильна кореляція ($r > 0,7$).

Результати проведених нами досліджень вказують на наявність зв'язку між рівнем експресії прогностично важливого антигену CD38 та лектинових рецепторів на мембрані лейкоцитних В-клітин при ХЛЛ. Важливою ознакою профілю їх лектинових рецепторів є поява у 27% випадків на мембрані пухлинно-асоційованого антигену Т, який виявляється лектином PNA. Слід зазначити, що антиген Т експресований більшою мірою на CD38⁺ лімфоцитах. Таким чином, CD38⁺ В-лімфоцити можна охарактеризувати як PNA⁺WGA⁻.

Характер взаємозв'язку між лектиновими рецепторами і CD антигенами переважно залишається неясним. Можна думати, що CD антигени містять глікозиди, що взаємодіють з лектинами певної специфічності, а зміни конфігурації глікозидної частини цих рецепторів впливають на їх функціональну і лектинову специфічність. Підвищення експресії CD38 супроводжується збільшенням числа клітин, на поверхні яких містяться

антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA) та глікозидні залишки антигену А (лектин SBA), властиві для О-гліканів, термінальна Fucα (лектин LAL) та знижується рівень сіалізованих поліантених N-гліканів з ланцюгам комплексного (I і II) і гібридного типу (RCA, PHA-L, WGA, STL).

Висновки

1. При ХЛЛ високий рівень експресії CD38 супроводжується підвищенням відсотка клітин, на поверхні яких міститься пухлино-асоційований антиген Томсена-Фріденрайха (лектин PNA), та позитивно корелює з рівнем антигену А (лектин SBA) та термінальною Fucα (лектин LAL).

2. Підвищений рівень експресії CD38 характеризується зменшенням взаємодії клітин з лектином RCA, який виявляє глікозидні залишки Galβ, та негативно корелює із зниженням сіалізованих залишків GlcNAcβ (лектин WGA, STL), залишків нейрамінової кислоти (NANA, лектин SNL) та поліантених N-гліканів (лектин PHA-L).

Література

1. Логінський В. Лектинзв'язувальні вуглеводні компоненти мембрани бластических клітин при гострому мієлоїдному лейкозі / В. Логінський, О. Шалай // Онкологія. – 2004. – Т. 6, № 3. – С. 231–235.

2. Пашенко С. Застосування лектинів в онкології / С. Пашенко // Онкологія 2011. – Т. 13, № 3. – С. 188–191.

3. A residue critical for the binding of the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen / P. Adhikari, K. Bachhawat-Sikder, C. Thomas [et al.] // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, № 44. – С. 40734–40739.

4. Gabius H.-J. Glycohistochemistry: the why and how of detection and localization of endogenous lectins / H.-J. Gabius // Anat.Histol. Embryol. – 2001 – Vol. 30, № 1. – P. 3–31.

5. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. / M. Hallek, B. Cheson, D. Catovsky [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 12. – P. 5446–5456.

6. Razi N. Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation / N. Razi, A. Varki // Glycobiol. – 1999. – Vol. 9, № 11. – P. 1225–1234.

7. Santos F. Small lymphocytic lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: are they the same disease? / F. Santos, S. O'Brien // Cancer J. – 2012. – Vol. 18, № 5. – P. 396–403.

8. Sharma V. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site / V. Sharma, M. Vijayan, A. Suroliа // J Biol Chem. – 1996. – Vol. 271. – P. 21209–21213.

9. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S. Swerdlow, E. Campo, N. Harris [et al.] – Lyon: IARC, 2008. – 439 p.

Надійшла 07.11.2017 року.