

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ БЛАСТНОМ КРИЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

М.Ф. ХАРЧЕНКО, Л. П. РЫБАКОВА, Л.И. ФИЛАНОВСКАЯ, Л.Б. САЛТЫКОВА,
Е.С. БИТЮКОВА., Е.Г. ЩЕРБАКОВА, О.А. РУКАВИЦЫН, С.С. БЕССМЕЛЬЦЕВ,
К.М. АБДУЛКАДЫРОВ, М.М. БЛИНОВ

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии, 193024 г.Санкт-Петербург, 2,
Советская ул.,16; фа.кс (812) 274-92-27

Исследовано содержание ядерных НМГ -белков, активность ОДК, АДА и ПНФ, а также содержание и состав ГАГ в лейкоцитах больных миелоидным и лимфоидным вариантами бластного криза. хронического миелолейкоза. Установлено, что цитоморфологические БК ХМЛ отличаются между собой по изученным биохимическим показателям. Показано, что содержание НМГ-белков, активности ОДК и ПНФ, а также электрофоретический профиль ГАГ могут использоваться при дифференциации вариантов БК ХМЛ.

Принятые сокращения: ХМЛ-хронический миелолейкоз, БК ХМЛ -бластный криз хронического миелолейкоза., НМГ-группа ядерных негистоновых белков с высокой электрофоретической подвижностью, ОДК- орнитиндекарбоксилаза, АДА- аденозиндезаминидаза, ПНФ-пуриинукле-озидфосфорилаза, ГАГ- гликозаминогликаны, ХС-хондроитинсульфат, ГС-гепарансульфат

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, бластный криз хронического миелолейкоза, ядерные белки, ферменты, гликозаминогликаны

ВВЕДЕНИЕ. Нарушение дифференцировки гемопоэтических клеток в результате повреждений генетического аппарата и механизмов регуляции гемопоэза при лейкозной трансформации обуславливает фенотипическое разнообразие, незрелость и функциональную неполноценность клеток. Усиление генетической нестабильности в результате прогрессии лейкозного процесса, на фоне существенных изменений гемопоэтического микроокружения при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) приводит к клональной эволюции, появлению дополнительных хромосомных нарушений, амплификации и перестройкам онкогенов, супрессии или точечным мутациям антионкогенов [1]. В связи с этим происходит переход заболевания из хронической фазы в прогрессирующую и, наконец, в бластный криз, при котором в костном мозге и крови появляется значительное количество бластных. клеток, сходных по своим характеристикам с таковыми при острых лейкозах. Ввиду того, что при ХМЛ лейкозная трансформация происходит на уровне полипотентной стволовой клетки, нарушение генетических программ клеточной дифференцировки и блок созревания при бластном кризе (БК) ХМЛ могут приводить к появлению бластных элементов, имеющих разнообразные фенотипические особенности. В связи с этим выделяют несколько цитоморфологических вариантов БК ХМЛ (миелоидный, лимфоидный, не классифицируемый, смешанный, а внутри миелоидного - эритробластный, мегакарио-бластный и др. подварианты) [2,3]. Лейкоциты больных БК ХМЛ являются предметом преимущест-

венно морфологических, цитохимических и иммунологических исследований.

Целью настоящей работы являлось исследование биохимических особенностей лейкоцитов больных с двумя главными цитохимическими вариантами БК ХМЛ - миелоидным и лимфоидным. Определяли содержание НМГ-белков клеточного ядра, играющих важную роль в организации транскрипционно активного хроматина [4,5], активность ОДК - ключевого фермента биосинтеза полиаминов-регуляторов клеточной пролиферации [6], активности ферментов деградации предшественников нуклеиновых кислот, участвующих в деградации пуринов - АДА и ПНФ [7]. Наряду с этим, исследовали содержание и состав ГАГ - соединений, выполняющих многообразные внутриклеточные и внеклеточные функции [8].

МЕТОДИКА. Исследования проводились у больных ХМЛ в стадии бластового криза (содержание бластных клеток в периферической не менее 30 %). Диагностику варианта БК ХМЛ осуществляли на основе клинико-гематологических и цитохимических данных. Объектом изучения служила обогащенная бластными клетками моноклеарная фракция лейкоцитов, полученная при центрифугировании периферической крови в градиенте плотности фиколл-верографина ($d=1,077$) или лейкоциты, выделенные желатино-цитратным методом [9].

Ядра для последующего выделения НМГ-белков получали по методу Пенмана [10]. Выделение ядерных НМГ-белков производили посредством экстракции ядер 5 % HClO_4 после предварительного и последующего осаждения ацетоном [11].

Активность ферментов, катализирующих деградацию пуринов - АДА и ПНФ определяли в клеточных, лизатах радиоизотопными методами с использованием меченых субстратов: ^3H -аденозина или ^3H -инозина. Продукты реакции изолировали с помощью бумажной хроматографии [12]. Активность ферментов выражали в единицах (ед.) (нмоль превращенного субстрата / 10^6 лейкоцитов / 1 час инкубации при 37°C). Активность ОДК определяли по количеству $^{14}\text{CO}_2$, образующегося из ^{14}C -орнитина [13], единица, активности ОДК соответствовала 1 нмоль $^{14}\text{CO}_2$ / час / 10^9 клеток. Выделение, фракционирование и идентификацию ГАГ лейкоцитов производили, как описано ранее [14]. Процедура включала депротеинизацию клеток, осаждение ГАГ цетавлоном, последовательную экстракцию не- и низкосульфатированных ГАГ 0,5M NaCl (фракция I), а сульфатированных - 2M NaCl (фракция II). Для анализа состава ГАГ использовали электрофорез на ацетатцеллюлозных пленках, энзиматическую и химическую обработку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты определения содержания НМГ-белков, активности ОДК, АДА и ПНФ, а также содержания ГАГ в лейкоцитах больных миелоидным и лимфоидным вариантами БК ХМЛ приведены в таблице.

Исследования содержания лейкоцитарных ядерных НМГ-белков, проведенные у 20 больных БК ХМЛ, показали наличие, с одной стороны, существенных, различий по этому параметру между миелоидным и лимфоидным вариантами заболевания, а с другой его значительные колебания внутри каждого из вариантов. Из данных, представленных в таблице, следует, что уровень НМГ-белков в лейкоцитах при БК ХМЛ миелоидного типа составляет в среднем $3,3 \pm 0,3$ мкг / 1 мг сухого веса клеток, тогда, как при лимфоидном он примерно в 6 раз выше. Как известно, НМГ-белки являются важным структурным компонентом хроматина. Благодаря способности взаимодействовать с ДНК, гистонами и другими компонентами, они участвуют в структурных перестройках хроматина и играют важную роль в регуляции экспрессии генетической информации, пролиферативной активности и дифференцировки клеток [5,15]. Содержание НМГ-белков (в отличие от их фракционного состава, который является весьма, консервативным), является важной фенотипической характеристикой клеток, что подтверждается полученными в работе данными. Следует отметить, что более высокий уровень НМГ-белков в лимфоидных клетках, по сравнению с миелоидными, отмечался нами также ранее при сопоставлении такового в лимфоцитах и гранулоцитах в норме и при других вариантах лейкоза. [16].

Таблица. Биохимические показатели лейкоцитов у больных ХМЛ в стадии бластного криза

Исследуемый показатель	Цитохимический вариант БК ХМЛ	
	Миелоидный	Лимфоидный
Содержание ядерных НМГ белков (мкг/мг сухого веса)	$3,3 \pm 0,3^{**}$ (1,0- 5,0) n= 11	$18,2 \pm 3,2^{**}$ (10,0- 30,0) n=9
Активность ОДК (нмоль $^{14}\text{CO}_2$ /час на 10^9 клеток)	$33,9 \pm 4,4^*$ (14,6 - 61,2) n= 16	$5,9 \pm 1,7^*$ (1,7- 10,7) n=7
АДА (нмоль превращ. субстрата/ 10^6 клеток/час)	445 ± 93 (111-1214) n=14	543 ± 102 (126 - 960) n=8
ПНФ (нмоль превращ. субстрата/ 10^6 клеток/час)	$422 \pm 55^*$ (136 - 725) n= 14	$109 \pm 14^*$ (73- 168) n= 8
АДА/ПНФ	$1,12 \pm 0,23^*$ (0,2,6-3,35) n=14	$5,43 \pm 1,12^*$ (0,86-9,26) n=8
Содержание ГАГ (мкг уроновых кислот / 100 мг сухого веса)	$105 \pm 14,1^*$ (43,0 -31.6,0) n=25	$33,8 \pm 5,2^*$ (14,5- 57,0) n=7

* - $P < 0,01$ ** $P < 0,001$

К числу биохимических факторов, играющих важную роль в регуляции клеточной пролиферации и лейкозной трансформации, относится ОДК. ОДК, катализирует превращение орнитина в путресцин. Он является ключевым, скорость лимитирующим ферментом в биосинтезе полиаминов - важных регуляторов клеточного роста, стимуляторов биосинтеза, нуклеиновых кислот и белков [6]. Недавно показано, что участие c-myc онкогена в регуляции пролиферации и дифференцировки клеток и некоторые другие его функции опосредуются в значительной степени через ОДК, ген которой является транскрипционной мишенью этого онкогена [17]. Активность фермента значительно повышается в пролиферирующих и лейкозно-трансформированных клетках и зависит как от пролиферативного потенциала клеток, так и их гистогенетических особенностей [6, 18, 19]. Результаты определения активности ОДК у больных ХМЛ в стадии бластного криза показали существенные различия миелоидного и лимфоидного вариантов заболевания и значительную вариабельность этого показателя внутри каждого варианта. Так, при миелоидном варианте заболевания активность фермента колебалась в пределах 14,6-61,2 ед, при средней величине $33,9 \pm 4,4$ ед., что примерно в 3 раза выше, чем в лейкоцитах больных ХМЛ в хронической фазе заболевания или в 10 раз выше, чем в гранулоцитах здоровых лиц [19]. Это свидетельствует о том, что чем выше степень миелоидной дифференциации, тем ниже активность фермента и, напротив, активность ОДК выше, когда повышается количество незрелых, способных к пролиферации клеток, что имеет место при БК ХМЛ. При лимфоидном цитохимическом варианте БК ХМЛ активность ОДК варьировала в пределах 1,7-10,7 ед., составляя в среднем $5,9 \pm 1,7$ ед. Подобная активность выявлялась и в бластных клетках больных ОЛЛ [19]. Несмотря на значительную вариабельность, активность фермента была ниже, чем у любого из пациентов с миелоидным вариантом БК ХМЛ, что свидетельствует о принципиальной возможности дифференциации миелоидного и лимфоидного вариантов БК ХМЛ на основе активности ОДК лейкоцитов.

Согласно полученным ранее данным, активности ферментов деградации пуринов - АДА и ПНФ, в значительной степени могут рассматриваться в качестве маркеров стадий дифференцировки клеток миелоидного и лимфоидного ряда [7,20,21]. В связи с этим представлял интерес к установлению ценности этих показателей в дифференциации вариантов БК ХМЛ. Анализ полученных в настоящем исследовании данных показал, что активности изучаемых ферментов и их соотношение широко варьируют (табл.). Относительно высокие показатели АДА при миелоидном БК ХМЛ

отмечались в группе из 6 больных с миеломонобластным цитохимическим подвариантом, составляя в среднем $7,11 \pm 179$ ед. У больных с миелобластным цитохимическим подвариантом (8 человек) они были ниже и составляли в среднем 245 ± 57 ед. Средние показатели активности ПНФ у этих групп больных были относительно высокими, различаясь в гораздо меньшей степени, и составляли 463 ± 122 и 392 ± 48 ед., соответственно. Соотношение АДА/ПНФ равнялось $1,73 \pm 0,23$ и $0,66 \pm 0,15$. Для миелоидного варианта БК ХМЛ в целом были характерны сходные средние значения активностей АДА и ПНФ и соотношение между ними было близко к 1. У больных лимфоидным вариантом БК ХМЛ активность АДА лейкоцитов значительно варьировала и составляла в среднем 543 ± 102 ед. Характерной особенностью бластных клеток являлись низкие показатели активности ПНФ 109 ± 14 ед., что примерно в 4 раза ниже, чем при миелоидном варианте БК ХМЛ. Вследствие относительно высоких показателей АДА и низких - ПНФ, отношение АДА/ПНФ при лимфоидном БК ХМЛ было в несколько раз выше, чем при миелоидном. Необходимо отметить, что лимфоидные клетки любой степени зрелости характеризуются низкой активностью ПНФ [20].

Результаты изучения активности ферментов деградации пуриновых нуклеотидов - АДА и ПНФ в лейкоцитах при миелоидном и лимфоидном вариантах БК ХМЛ указывают на фенотипическую гетерогенность клеточного субстрата при этом заболевании, о чем свидетельствует значительная вариабельность изучаемых показателей внутри каждого из вариантов. Вместе с тем на основе полученных данных можно заключить, что показатели активности ПНФ и отношения АДА/ПНФ могут использоваться в качестве биохимических критериев дифференциации миелоидного и лимфоидного вариантов БКХМЛ.

Наряду с содержанием НМГ-белков, активностью ОДК и активностью ферментов деградации пуриновых нуклеотидов в качестве биохимического показателя лейкоцитов больных ХМЛ в стадии бластного криза исследовали содержание и состав ГАГ. ГАГ в форме структурных компонентов протеогликанов или свободных полисахаридных цепей являются компонентами всех типов гемопоэтических и лимфоидных клеток, начиная с полипотентных стволовых клеток и коммитированных предшественников и кончая зрелыми лейкоцитами [8,22-24]. Они локализуются преимущественно в составе цитоплазматических гранул, хотя присутствуют также на плазматической мембране и ядре, выполняя многообразные внутриклеточные и внеклеточные функции - участвуют в хранении гранулярных катионных белков с ферментативной и цитолитической активностью и других биоактивных субстанций, в медиации межклеточных взаимодействий, а высвобождаясь из клеток, могут становиться модуляторами многих клеточных процессов и участвовать в регуляции гемопоэза и иммунологических реакций. Показано, что состав и структура ГАГ-цепей, содержание и электрофоретический профиль являются маркерами фенотипа, нормальных и лейкозно-трансформированных клеток [25].

Исследования содержания ГАГ в лейкоцитах больных миелоидным вариантом БК ХМЛ показали, что средний уровень этих соединений составляет 115 ± 15 мкг уроновых кислот/100 мг сухого веса клеток, что более чем в 2 раза ниже, чем в хронической фазе заболевания. Относительно низкие значения ($36,5 - 76,5$ мкг) отмечались у больных с бластемией (12 больных с содержанием бластных клеток в периферической крови от 40 до 95 %), высокие ($255 - 316$ мкг) - у единичных больных с базофилией (20-45 % базофилов). Анализ результатов исследования состава ГАГ с помощью электрофореза, в кальций-ацетатном буфере, обработки специфическими для ГАГ ферментами (бактериальной и тестикулярной гиалуронидазами, хондроитиназами АС и АВС), а также HNO_2 , позволяющих идентифицировать основные классы этих соединений, показал, что главным представителем является ХС, выявляемый как во фракции ГАГ с низким зарядом (фракция I), так и во фракции II - с высоким зарядом. Об этом

свидетельствовали расщепляемость тестикулярной гиалуронидазой и хондроитиназами, а также резистентность к обработке бактериальной гиалуронидазой и HNO_2 . Согласно литературным данным, ХС в составе протеогликана (серглицина) является структурным компонентом различных типов гемопозитических клеток [24]. Наряду с ХС, в составе ГАГ был идентифицирован ГС, расщепляемый HNO_2 , но резистентный к указанным ферментам, как правило, в виде минорного компонента, за исключением случаев с базофилией, где он становился мажорным или доминирующим. Он выявлялся преимущественно во фракции ГАГ II и иногда в обеих фракциях. Кроме ХС и ГС, у 4 больных с миеломонобластным подвариантом БК ХМЛ открывался в следовых количествах дерматансульфат, который обнаруживался на электрофореграммах после обработки ГАГ хондроитиназой АС или тестикулярной гиалуронидазой. Одной из особенностей состава ГАГ лейкоцитов больных миелоидным БК ХМЛ являлось наличие, помимо ХС и ГС, неидентифицированной фракции, имеющей низкую подвижность в кальций-ацетатном буфере (рис), частично или полностью расщепляемой хондроитиназой АВС и тестикулярной гиалуронидазой, и обозначенной нами как ГАГм. Подобная фракция была обнаружена нами ранее в бластных клетках у больных острыми нелимфобластными лейкозами [25] но не выявляется в зрелых гранулоцитах и лейкоцитах больных ХМЛ. По-видимому, ее синтез происходит в миелоидных гемопозитических клетках на ранних стадиях дифференцировки.

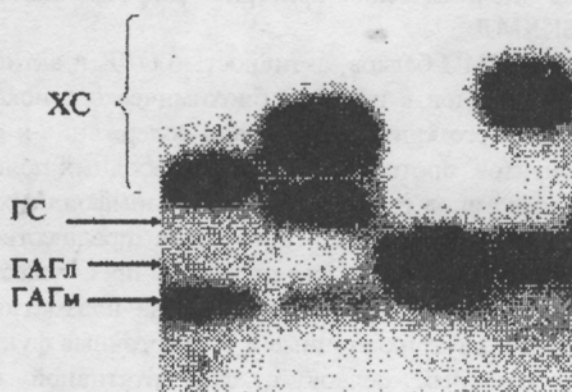


Рисунок.

Электрофоретический профиль ГАГ лейкоцитов больных БК ХМЛ (электрофорез на ацетат-целлюлозной пленке; 0,2М калий-ацетатный буфер, pH 5,2)

1 - фракция ГАГ- I при миелоидном варианте БК-ХМЛ. 2 - фракция ГАГ- II при миелоидном варианте БК-ХМЛ. 3 - фракция ГАГ- I при лимфоидном варианте БК-ХМЛ. 4 - фракция ГАГ- II при лимфоидном варианте БК-ХМЛ

Лейкоциты больных с лимфоидным вариантом БК ХМЛ характеризовались более низким содержанием ГАГ, чем лейкоциты больных с миелоидным вариантом. Оно составляло в среднем $33,8 \pm 5,2$ мкг уроновых кислот/100 мг сухого веса клеток при колебаниях 14,5-57,0 мкг. ГАГ были представлены ХС (преимущественно во фракции II с высоким зарядом) и неидентифицированной фракцией с несколько более высокой подвижностью в кальций-ацетатном буфере, чем у аналогичной фракции больных миелоидным БК ХМЛ, обозначенной как ГАГл (рис). Подобная фракция была выявлена ранее у больных острым лимфобластным лейкозом и хроническим лимфолейкозом [25]. ГС при лимфоидном варианте БК ХМЛ не выявлялся.

Суммируя результаты исследования ряда биохимических показателей - ядерных белков, ферментных систем биосинтеза полиаминов и деградации пуриновых нуклеотидов, а также содержания и состава ГАГ в лейкоцитах больных миелоидным и лимфоидным вариантами БК ХМЛ, можно сказать, что они дают новую информацию относительно биохимического фенотипа лейкозотрансформированных клеток, дифференцировка которых заблокирована на ранних стадиях свидетельствуют о гетерогенности клеточных проявлений в его терминальной фазе (бластном кризе) и кроме того, повидимому, имеют определенную практическую ценность, поскольку способствуют улучшению диагностики различных вариантов заболевания.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Foti A., Ahuja M., Allen S. et al (1991) Blood, 77, 2441-2444.
2. Saikia T., Advani S., Dasgupta. A. et al. (1988) Leukemia Res. 12, 499-506
3. Барышников А.Ю., Туркина. А.Г., Фролова Е.А., и др. (1994) Эксперим. онкол. 16, 169-175.
4. Калантаров А.И., Махмудова. А.А., Хашимова. З.С., Садыков А.С. (1989) ДАН СССР. 287, 728-731
5. Einck L., Bustin M. (1985) Exp. Cell Res., 156, 296-310.
6. Tabor C., Tabor H. (1984) Ann. Rev. Biochem., 53, 749-790.
7. Филановская Л. И., Блинов М.Н. (1986) Вопр. мед. хим. 32, 10-17.
8. Харченко М.Ф., Рыбакова. Л.П., Голенко О.Д. и др. (1996.) Физиол. журнал. 32, 18-25.
9. Луганова И.С., Сейц И.Ф. (1967). Лаб. Дело, 9, 521-526.
10. Пенман Ш. (1972) Методы: вирусологии и молекулярной биологии. М.: Мир. 31-42.
11. Rabbani A., Goodwin G., Johns E. (1978) Biochem. J, 173, 497-505,
12. Филановская Л.И., Вартамян Н.Л., Того А.В. и др. (1985), Вопр. мед. хим. 31, 48-53.
13. Блинов М.Н., Луганова И.С., Владимирова А.Д., Салтыкова. Л.Б. (1985). Вопр. мед. хим., 31, 90-92.
14. Харченко М.Ф., Остроумова. С.С., Штатская Т.Л., Битюкова Е.С. (1984). Лаб. дело 9. 534-537.
15. Негрей Г.З., Яниш Ю.В., Завелевич М.П., Шляховенко В.А (1990) Эксперим. онкол. 12, 65-67.
16. Рыбакова. Л.П. (1991) Вопр. онкол. 37, 805-812.
17. Bello-Fernandez C., Packham G., Cleveland J. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 7804-7808.
18. Auvinen M., Paasinen A., Anderson L.C., Holttä E. (1992). Nature, 360, 355-361,
19. Салтыкова. Л.Б., Блинов М.Н. (1987). Эксперим. онкол. 9, 18-21.
20. Филановская; Л.И., Того А.В., Цвейбах А.С. (1987) Вопр. мед. хим. 33, 16-21.
21. Филановская Л.И., Того А. В., Щербакова. Е.Г. и др. (1990) Вопр. онкол. 36, 1053-1058.
22. Shiota T., Minguell J.J., Tavassoli M. (1992) Biochim. Biophys. Acta. 1136, 17-22.

23. *Morris A., Dexter T., Gallagher J.* (1989) *Biochem. J.*, **260**, 479-486.
24. *Kolset S., Gallagher J.* (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1032**, 199-211.
25. *Харченко М.Ф., Шатская Т.Д., Щербакова Е.Г., Абдулкадыров К.М.* (1986) *Вопр. онкол.* **32**, 47-53.

SOME BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LEUKOCYTES IN BLAST CRISIS OF CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA

M.F.KHARCHENKO, L.P.RYBAKOVA, L.L.FILANOVSKAYA, L.B.SALTYKOVA,
H.S.BITIUKOVA, H.G.SHERBAKOVA, O.A.RUKAVITSIN, S.S.BESSMELTSEV,
K.M.ABDULKADYROV, M.N.BIMOV

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, SPetersburg

The content of nuclear high mobility group (HMG) proteins, activities of ornithine decarboxylase (ODC), adenosine deaminase (ADA) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) and also glycosaminoglycan (GAG) content and composition were studied in leukocytes of patients with chronic myelogenous leukemia in the phase of blast crisis (BC CML). Myeloid and lymphoid cytochemical variants of BC CML differ by biochemical parameters. It is suggested, that the content of HMG-proteins, activities of ODC and PNP, and electrophoretic patterns of GAGs could be used in diagnostics of two main variants of BC CML.

Key words: chronic myelogenous leukemia, blast crisis of chronic myelogenous leukemia, nuclear proteins, enzymes, glycosaminoglycans