DOI: 10.26693/jmbs06.06.141

УДК 612.017:577.112.577.15.616.15-07

Маслак Г. С.¹, Черненко Г. П.², Байбаков В. М.², Виселко А. Д.²,Письменецька І. Ю.², Копацька М. В.², Коновалова О. С.²

ЗМІНИ ГЛІКАНОВИХ ДЕТЕРМІНАНТ МЕМБРАН ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА В –КЛІТИННИЙ ХРОНІЧНИЙ ЛІМФОЛЕЙКОЗ ЗА УМОВ ПРОТИПУХЛИННОЇ ТЕРАПІЇ

¹Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, Україна

²Дніпровський медичний інститут традиційної і нетрадиційної медицини, Дніпро, Україна

Мета. Вивчити характер змін експонування поверхневих гліканів лімфоцитів периферичної крові хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз за умов протиопухлинної терапії.

Матеріал та методи. Досліджували характер експонування поверхневих глікотопів лімфоцитів периферичної крові хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз за умов протиопухлинної терапії з використанням набору з семи лектинів, мічених ФІТЦ та моноклональних антитіл до Тп-антигену та вторинних антитіл до імуноглобулінів миші, кон'югованих з ФІТЦ для виявлення експонування Тп-антигену та CD43 на лімфоцитах крові. Цитостатична (СОР-терапія) включала циклофосфамід, вінкрестин (онковін), преднізолон. Реєстрацію даних проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS.

Результати. Кількість лімфоцитів здорових донорів з позитивною реакцією на ConA, PHA-L, SNA, MAA-II та α 1-кислий глікопротеїн складала $16,0 \pm 3,0\%$, $23,0 \pm 2,3\%$, $15,0 \pm 1,5\%$, $25,0 \pm 1,8\%$ та $15,0 \pm 1,3\%$ відповідно. Кількість LABA-, UEA I-позитивних становила $0,90 \pm 0,03\%$ та $2,9 \pm 0,2\%$, відповідно, а зв'язування з антитілами до Тп- та CD43-антигенів було відсутнім. У крові хворих на хронічний лімфолейкоз рівні ConA-, SNA- та MAA-II-позитивних клітин щодо норми зростали відповідно у 2,2, 3,7 та 2,6 разів. Кількість LABA- та UEA I-позитивних клітин підвищувалася в 11 ($p < 0,01$) та 23 ($p < 0,001$) рази і становила $10,5 \pm 0,5\%$ та $67,5 \pm 5,5\%$ відповідно. Кількість лімфоцитів у хворих, які виявили на своїй поверхні CD43-антиген, зростала у 72, а Тп-антиген – у 80 разів. Під дією СОР-терапії майже наполовину було знижено рівень LABA- та UEA I-позитивних лімфоцитів, на третину – MAA II-позитивних клітин та лімфоцитів, що взаємодіють з антитілами до CD43- та Тп антигену. Рівень PHA-L-позитивних лімфоцитів у крові хворих на хронічний лімфолейкоз після проходження СОР-терапії підвищився на $18,0 \pm 2,0\%$ і майже не відрізнявся від отриманих у контрольній групі.

Висновки. У хворих на хронічний лімфолейкоз у лімфоцитах периферичної крові змінюється

структура глікокон'югатів, що проявляється у посиленні експонування L-фукози, α -маннози та N-ацетилнейрамінової кислоти, що підтверджено значним зростанням відносно контролю кількості ConA-, SNA-, MAA-II-, LABA- та UEA I-позитивних клітин. У хворих на хронічний лімфолейкоз виявлено значне зростання кількості лімфоцитів, які виявляли на своїй поверхні маркери канцерогенезу CD43- та Тп-антигени. СОР-терапія достовірно знизила рівень LABA-, UEA I- та MAA II-позитивних клітин, а також частково Тп – та CD43-антиген-позитивних лімфоцитів, що свідчить про її позитивний вплив на лікування хронічного лімфолейкозу.

Ключові слова: В-клітинний хронічний лімфолейкоз, лектини, моно- та поліклональні антитіла, мембрани лімфоцитів, глікани, глікокон'югати.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота є фрагментом комплексних тем «Посттрансляційні зміни (модифікації) білків за умов патологічних процесів» (№ державної реєстрації 0114U001279), та «Структурно-функціональні зміни білків при оксидативно-карбонільному стресі та їх корекція під дією терапевтичних заходів» (№ державної реєстрації 0118U006025).

Вступ. В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) є достатньо розповсюдженим різновидом злоякісних лімфом, які супроводжуються накопиченням зрілих злоякісних В-лімфоцитів у крові, кістковому мозку, лімфатичних вузлах, печінці та селезінці. Функціональна неповноцінність цих клітин з порушенням механізмом антитілоутворення спричиняє у таких хворих інфекційні ускладнення [1], які часто виступають у якості сигналу для медичного обстеження і виявлення хвороби. Сучасні уявлення про патогенез В-ХЛЛ обмежені, оскільки досі достовірно не відомі конкретні генетичні вади, що призводять до цих захворювань [2]. Однак безперечним є ствердження, що генетичні зміни, пов'язані із злоякісною трансформацією, неминуче супроводжуються зміною глікозилування білків, про що свідчать змінені глікопрофілі багатьох маркерів раку. Відомо, що глікани відіграють суттєву

роль у проліферації пухлин, інвазії, гематогенному метастазуванні та ангиогенезі [3].

Епігенетична регуляція глікозилтрансфераз у ракових клітинах призводить до створення нових гліканових структур, які вірогідно є одним з механізмів, що використовуються раковими клітинами для ухилення від імунної відповіді господаря [4]. Інструментом дослідження гліканових структур глікопротеїнів є специфічні моно- та поліклональні антитіла та комплекс лектинів – білків рослинного походження, здатних високоспецифічно зв'язувати залишки вуглеводів [5].

Лікування В-ХЛЛ включає комбінації цитостатичної і променевої терапії, які спрямовані в першу чергу на зниження кількості лейкозних клітин [1]. Показанням до початку хіміотерапії є перехід захворювання в активну стадію (II-III, за класифікацією K.R. Rai), наростання лейкоцитозу (вище $50 \times 10^9/\text{л}$) та інші клінічні та біохімічні показники, такі як аутоімунні цитопенії, прогресуючі спленомегалія та лімфоаденопатія, зміна форми лейкоцитів під час подвоєння [6].

Цитостатична терапія включала алкілюючі агенти (наприклад, хлорамбуцил) поодиночі [7] або в комплексі з антрациклінами і алкалоїдами барвінку. Наприклад, сполучення циклофосфаміду, вінкристину та преднізолону відповідають СОР-терапії, а долучення до цього комплексу препаратів доксорубіцину – СНОР-лікуванню [8, 9]. Основними шляхами цитостатичної дії препаратів на клітину є проникнення, активація, пошкодження мішені, загибель клітини (апоптоз), або перехід у функціонально неактивну субпопуляцію «дрімаючих» клітин [10]. Мішенню алкілюючих агентів є нуклеотиди, а антрациклінів і алкалоїдів барвінку – цитоплазматичні мікротрубочки та веретено поділу клітин [11]. Загальним результатом дії цитостатичної хіміотерапії на клітину є пошкодження ліпідних компонентів плазматичних мембран, ДНК, клітинних та поверхневих білків, що викликає дисбаланс клітинного гомеостазу – клітинний стрес, який ініціює дію складного каскаду стрес-індукованих сигнальних молекул для повернення клітини до свого попереднього стану рівноваги [12]. Клітинний стрес стимулює включення «відповіді на неправильно згорнуті протеїни» в ендоплазматичному ретикулумі [13], а оскільки N- та O-глікозилування є важливою частиною системи контролю якості та сортування згорнутих білків [14], порушення цього процесу призводить до появи глікопулу білків та ліпідів із зміненою вуглеводною структурою [15]. Вони визначають здатність клітини до взаємодії з іншими клітинами та антигенами [16,17], її здатність до апоптозу [18] або резистентності до ліків [19].

Мета дослідження. Вивчення характеру змін експонування поверхневих гліканів лімфоцитів периферичної крові хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз за умов протипухлинної терапії.

Матеріал та методи дослідження. Об'єктом дослідження були лімфоцити крові хворих на хронічний лімфолейкоз ($n=15$) у віці 58-66 років до та після проведення курсу стандартної поліхіміотерапії за схемою СОР (циклофосфамід 750 мг/м^2 в/в у 1-й день, вінкристин (онковін) $1,4 \text{ мг/м}^2$ в/в у 1-й день, преднізолон у дозі 40 мг/м^2 протягом 5 днів). Експресія антигену CD19⁺ за результатами імуногістологічного та цитологічного аналізів виявлена у 85-90% клітин.

Контрольну групу становили волонтери ($n=15$) у віці від 55 до 65 років. Лікування за програмою СОР призначалось в якості першої лінії терапії хворим на хронічний лімфолейкоз виходячи з конкретних клініко-гематологічних показників. Всі пацієнти проходили лікування у спеціалізованому відділенні онкогематологічного центру КЗ міської багатопрофільної клінічної лікарні №4 ДОР м. Дніпро. Діагноз онкологічних захворювань крові у хворих був верифікованим згідно з загальноприйнятими клінічними та морфологічними критеріями, які закріплені Наказом МОЗ України № 554 від 17.09.2007р. «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «онкологія» із доповненнями згідно з Наказом МОЗ України № 645 від 30.07.2010р. Відбір біологічного матеріалу проводили згідно принципів біоетики та медичної деонтології. Всі учасники були інформовані щодо цілей, організації, методів дослідження та підписали згоду щодо участі у ньому. Були вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

Виділення лімфоцитів з гепаринізованої крові (20-25 ОД гепарину на 1 мл крові) проводили за модифікованим методом А. Воуїт [20]. Для отримання В-лімфоцитів у контрольній групі суспензію лімфоцитів поділяли на фракції Т- і В-клітин, використовуючи колонки з синтетичної вати за методом Р.Тerasaki. Життєздатність клітин визначали за допомогою триптанового синього (вона була більше 90%).

Експонування α_1 -кислого глікопротеїну (АГП) і фібронектину (ФН) визначали з використанням поліклональних антитіл до АГП (Life Span Biosciences, USA) та вторинних антитіл кролика, мічених фікоеритрином (Santa Cruz, USA), а також моноклональних антитіл до матричного ФН (AbD Serotec, UK) та відповідних вторинних антитіл до імуноглобулінів миші, кон'югованих з флуоресцентнізотіоціанатом – ФІТЦ (Millipore, USA). Експонування **Tn-антигену та CD43 на лімфоцитах крові** визначали з використанням моноклональних антитіл до **Tn-антигену** та вторинних антитіл до іму-

ноглобулінів миші, кон'югованих з ФІТЦ (Millipore, USA).

Для дослідження експонування гліканів на мембранах лімфоцитів використовували набір із семи лектинів, мічених ФІТЦ: ConA – лектин канавалії звичайної: *Canavalia ensiformis* (Лектинотест, Україна); PHA-L – фітогемаглютинин L: *Phytohemagglutinin L* (Лектинотест, Україна); LABA – лектин кори золотого дощу звичайного: *Laburnum anagroides* (Лектинотест, Україна); UEA I – лектин дроку англійського: *Ulex europaeus agglutinin* (Vector Laboratories, USA); MAA II – лектин маакії амурської: *Maackia amurensis* (Vector Laboratories, USA); SNA – лектин бузини чорної: *Sambucus nigra* (Лектинотест, Україна).

Реєстрацію даних проводили на проточному цитометрі Beckman Coulter EPICS. Обробку результатів робили за допомогою програми FCS3 Express.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження гліканових профілів мембранних глікопротеїнів лімфоцитів показало, що кількість лімфоцитів з позитивною реакцією на ConA, PHA-L, SNA, MAA-II та α_1 -кислий глікопротеїн, які циркулюють в кровообігу здорових донорів, коливалась в межах значень від 15 до 25 відсотків та становила $16,0 \pm 3,0\%$, $23,0 \pm 2,3\%$, $15,0 \pm 1,5\%$, $25,0 \pm 1,8\%$ та $15,0 \pm 1,3\%$, відповідно. Досить високий показник рівню лімфоцитів, які взаємодіяли, був отриманий з використанням антитіл до фібрoneктину та становив майже $72,0 \pm 6,0$ відсотків. Зв'язування з іншими ФІТЦ-кон'югатами лектинів або антитілами в групі контролю було незначним або практично відсутнім. Так, кількість LABA-, UEA I-позитивних становила $0,90 \pm 0,03\%$ та $2,9 \pm 0,2\%$, відповідно, а зв'язування з антитілами до Tn- та CD43-антигенів було відсутнім (рис. 1).

У групі хворих на ХЛЛ спостерігався перерозподіл лектин-позитивних лімфоцитів: рівні ConA-, SNA- та MAA-II-позитивних клітин зростали щодо контролю відповідно у 2,2, 3,7 та 2,6 рази. Ці дані свідчать, що у глікановому профілі глікопротеїнів лімфоцитів хворих зросли рівні α -D- маннози та N-ацетілнейрамінової кислоти.

Відомо, що маннозозбагачені глікани входять до складу патоген-асоційованих молекул, які сигналізують про чужорідні антигени та ініціюють активацію макрофагів, виступаючи у якості мітки біологічної небезпеки для залучення імунних клітин [21]. Кількість LABA- та UEA I-позитивних клітин периферичної крові хворих на ХЛЛ підвищувалась в 11 ($p < 0,01$) та 23 ($p < 0,001$) рази і становила $10,5 \pm 0,5\%$ та $67,5 \pm 5,5\%$, відповідно. Це свідчить про зростання в гліканових профілях лімфоцитів хворих залишків L-фукози та α -D галактози. Кількість PHA-L-позитивних лімфоцитів периферичної

крові хворих на ХЛЛ знижувалась на 83% ($p < 0,01$) порівняно з контролем, а рівень АГП-позитивних лімфоцитів був знижений на 62%. Щодо фібрoneктину у хворих кількість антиген-позитивних лімфоцитів не відрізнялась від контролю (рис. 1).

Рис. 1 – Кількість лімфоцитів із поверхневою локалізацією глікотопів до ФІТЦ-мічених лектинів та антитіл до Tn-антигену та CD43, АГП та фібрoneктину у периферичній крові хворих на хронічний лімфолейкоз до проведення та після проведення СОР-терапії

Примітка: * – вірогідна різниця у порівнянні з контрольною групою норми при $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$.

Найбільшу різницю між показниками в контрольній групі та групі хворих було відзначено при використанні антитіл до Tn- та CD43-антигенів. У хворих на хронічний лімфолейкоз кількість лімфоцитів, яка виявляла на своїй поверхні CD43-антиген, зростала у 72, а Tn-антиген – у 80 разів. Антиген Tn (GalNAc α 1-Ser / Thr) являє собою неоантиген, який аномально експресується в багатьох карциномах людини. Його експресія корелює з метастазуванням і негативним прогнозом перебігу хвороби [22].

У свою чергу CD43-антиген це одноланцюговий мембранний глікопротеїн з високим ступенем O-глікозилювання та сіалізації. Слабка експресія CD43-антигену спостерігається на поверхні В-лімфоцитів, що покоються, але після їх активації відзначають підвищення його експресії. CD43 запобігає клітинній адгезії, приймає участь у ремоделюванні морфології Т-клітин та регулює міжклітинні взаємодії під час руху лімфоцитів. Експресія CD43 викликає індукцію функціонально активного білка-супресора пухлини p53, але у разі дефіциту p53 CD43 сприяє проліферації та життєздатності пухлини [23].

Значне зростання лімфоцитів, які виявляли на своїй поверхні ці антигени, свідчить про глибокі патологічні зміни у структурі глікобіому мембран лімфоцитів у хворих на ХЛЛ. Під дією СОР-терапії майже наполовину був знижений рівень LABA- та UEA I-позитивних лімфоцитів, на третину – MAA II-позитивних клітин та лімфоцитів, які взаємодіяли з антитілами до CD43-антигену.

Слід однак відзначити, що жоден з цих параметрів не досягав контрольних значень. При використанні лектину канавалії звичайної зв'язування з ФІТЦ-міченим кон'югатом було зафіксовано лише у одного відсотка клітин, отже, було значно нижчим за норму. Дослідження рівню РНА-L-позитивних лімфоцитів у крові хворих на ХЛЛ після проходження алкілюючої терапії показали, що значення цього показника підвищилось на $18,0 \pm 2,0\%$ і майже не відрізнялось від отриманих в контрольній групі (рис. 1).

Після проведення СОР-терапії кількість АГП- та SNA-позитивних лімфоцитів у хворих на ХЛЛ зростала приблизно в 1,5 рази. У випадку використання антитіл до АГП це зростання було пов'язано з наближенням значень цього показника до контрольних. Однак кількість SNA-позитивних лімфоцитів, які експресують N-ацетілнейрамінову кислоту, продовжувала збільшуватись навіть під дією СОР-терапії. Зміни сіалованості термінальних гліканів клітинних мембран вважають одним із суттєвих факторів інвазійного зростання пухлин [24, 25].

Висновки

1. У хворих на ХЛЛ у лімфоцитах периферичної крові виявлені зміни структури

глікокон'югатів, що проявляються у посиленні експонування L-фукози, α -маннози та N-ацетилнейрамінової кислоти, що підтверджено значним зростанням відносно контролю кількості ConA-, SNA-, MAA-II-, LABA- та UEA I-позитивних клітин.

2. У хворих на хронічний лімфолейкоз виявлено значне зростання кількості лімфоцитів, які виявляли на своїй поверхні маркери канцерогенезу CD43- та Tn-антигени.
3. СОР-терапія достовірно знизилася рівень LABA-, UEA I- та MAA II-позитивних клітин, а також частково Tn –та CD43-антиген-позитивних лімфоцитів, що свідчить про її позитивний вплив на лікування хронічного лімфолейкозу.

Перспективи подальших досліджень. Виявлені якісні зміни гліканових профілів глікокон'югатів мембран лімфоцитів хворих на ХЛЛ потребують подальшого дослідження їх кількісної презентації на мембранах клітин для розуміння ступеня їх пошкодження, створення профілів гліканових змін глікокон'югатів з метою уточнення діагнозу а також оцінки ефективності лікування. Для цього необхідне вивчення щільності розташування змінених глікопів на мембранах досліджуваних клітин.

References

1. Lapovets LE, Swan GB, Yastremskaya OO. *Vibrani lekciï z laboratornoï medicini. Chastina I. Gematologichni doslidzhennya* [Selected lectures of Laboratory Medicine. Part I. Hematological study]. 2013. s. 192-193 [Ukrainian]
2. Mohr A, Cumin M, Bagacean C, Pochard P, Le Dantec C, Hillion S, et al. The regulatory capacity of B cells directs the aggressiveness of CLL. *Oncoimmunology*. 2018 Dec 12;8(3):1554968. PMID: 30723588. PMCID: PMC6350696. doi: 10.1080/2162402X.2018.1554968
3. Rodrigues Mantuano N, Natoli M, Zippelius A, Läubli H. Tumor-associated carbohydrates and immunomodulatory lectins as targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020 Oct;8(2):e001222. PMID: 33020245. PMCID: PMC7537339. doi: 10.1136/jitc-2020-001222
4. Yehuda S, Padler-Karavani V. Glycosylated Biotherapeutics: Immunological Effects of N-Glycolylneuraminic Acid. *Front Immunol*. 2020 Jan 23;11:21. PMID: 32038661. PMCID: PMC6989436. doi: 10.3389/fimmu.2020.00021
5. Lutsik MD, Kusen' SI. Issledovaniye membrannykh glikoproteinov eritrotsitov s primeneniye lektinov [Study of erythrocyte membrane glycoproteins using lectins]. *Ukr Biokhim zhurn*. 1987;59(6):3-8. [Russian]
6. Hnatiuk OS, Tsymbal DO, Minchenko DO, Khita OO, Viletska YM, Rundyska OV, et al. Insulin receptor substrate 1 gene expression is strongly up-regulated by HSPB8 silencing in U87 glioma cells. *Endocrine Regulations*. 2020;54(4):231-243. PMID: 33885248. doi: 10.2478/enr-2020-0026
7. Lee Y. Roles of circadian clocks in cancer pathogenesis and treatment. *Exp Mol Med*. 2021;53:1529-1538. PMID: 34615982. PMCID: PMC8568965. doi: 10.1038/s12276-021-00681-0
8. Li HX. The role of circadian clock genes in tumors. *Onco Targets Ther*. 2019;12:3645-3660. PMID: 31190867. PMCID: PMC6526167. doi: 10.2147/OTT.S203144
9. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87:4990-4997. PMID: 8652811. doi: 10.1182/blood.V87.12.4990.bloodjournal87124990
10. Wierda WG, O'Brien SM. Initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2006;33:202-209. PMID: 16616067. doi: 10.1053/j.seminoncol.2006.01.014
11. Moreton P, Kennedy B, Lucas G, Leach M, Rassam SM, Haynes A, et al. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival. *J Clin Oncol*. 2005 May 1;23(13):2971-9. PMID: 15738539. doi: 10.1200/JCO.2005.04.021

12. Wierda WG. Current and investigational therapies for patients with CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006;285-294. PMID: 17124074. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.285
13. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):1845-53. PMID: 9058703. doi: 10.1182/blood.V89.6.1845
14. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*. 2000 Jan;65(1):95-106.
15. Samali A, Fulda S, Gorman AM, Hori O, Srinivasula SM. Cell Stress and Cell Death. *Int J Cell Biol*. 2010;2010:245803. PMID: 20339528. PMCID: PMC2843860. doi: 10.1155/2010/245803
16. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*. 2011;490:71-92. PMID: 21266244. PMCID: PMC3701721. doi: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0
17. Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(4):383-392. PMID: 21616652. doi: 10.1016/j.ceb.2011.05.001
18. Stanley P. Golgi Glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Apr 1;3(4):a005199. PMID: 21441588. PMCID: PMC3062213. doi: 10.1101/cshperspect.a005199
19. Häuselmann I, Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol*. 2014 Feb 13;4:28. PMID: 24592356. PMCID: PMC3923139. doi: 10.3389/fonc.2014.00028
20. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest*. 1968;21(97):1-9.
21. Zynganshina MM, Dolgushin NV, Kulikova GV, Fayzullina NM, Dovgan' AA, Abdurakhmanova NF, et al. Otsenka ekspressii glikanov v epitelial'nykh strukturakh endometriya kak prediktivnyy faktor retseptivnosti endometriya [Evaluation of glycan expression in the epithelial structures of the endometrium as a predictive factor for endometrial receptivity]. *Ginekologiya*. 2020;22(6):38-43. [Russian]
22. Matsumoto Y, Kudelka MR, Hanes MS, Lehoux S, Dutta S, Jones MB, et al. Identification of Tn antigen O-GalNAc-expressing glycoproteins in human carcinomas using novel anti-Tn recombinant antibodies. *Glycobiology*. 2020 Apr 20;30(5):282-300. PMID: 32415964. PMCID: PMC7724743. doi: 10.1093/glycob/cwaa044
23. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Ivanovskaya TS. Monoklonal'nyye antitela i immunotsitokhimicheskiye metody v diagnostike V-kletochnykh nekhodzhkinskikh limfom [Monoclonal antibodies and immunocytochemical methods in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin's lymphomas]. *Onkologiya*. 2015;3(39). [Russian]. Available from: <https://health-ua.com/article/6651-monoklonalnye-antitela-i-immunotsitohimicheskie-metody-v-diagnostike-vketo>
24. Gnedkova IA, Lisyany I, Stanetskaya DN. Lektinsvyazivayushchiye i tumorigennye svoystva kletok gliom S6 [Lectin-binding and tumorigenic properties of C6 glioma cells]. *Onkologiya*. 2015;17(1):4-11. [Russian]
25. Netronina O, Peleshenko H, Maslak H. Glycosylation of blood lymphocytes in inflammatory processes. *Aktual'ni problemy suchasnoyi biokhimiyyi, klitynnoyi biolohiyyi ta fiziolohiyyi: materialy V Mizhnarodnoyi naukovoyi konferentsiyi m. Dnipro, 2020*. Dnipro: Vydavnytstvo «Lira»; 2020. p. 113.

УДК 612.017:577.112.577.15.616.15-07

ИЗМЕНЕНИЯ ГЛИКАНОВЫХ ДЕТЕРМИНАНТОВ МЕМБРАН ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ В –КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В УСЛОВИЯХ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

**Маслак А. С., Черненко Г. П., Байбаков В. М., Виселко А. Д.,
Письменецкая И. Ю., Копацкая М. В., Коновалова Е. С.**

Резюме. Цель. Изучить характер изменений экспонирования поверхностных гликанов лимфоцитов периферической крови больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом в условиях противоопухолевой терапии.

Материал и методы. Исследовали особенности экспонирования поверхностных гликобелков лимфоцитов периферической крови больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом в условиях противоопухолевой терапии с использованием набора из семи лектинов, меченых ФИТЦ и антител к CD43 и Tn-антигенам. Цитостатическая терапия (СОР-терапия) включала циклофосфамид, винкристин (онковин), преднизолон. Регистрацию данных проводили на проточном цитометре Beckman Coulter EPICS.

Результаты. Количество лимфоцитов здоровых доноров с положительной реакцией на ConA, PHA-L, SNA, MAA-II и α 1-кислый гликопротеин составило 16,0 $\pm$ 3,0%, 23,0 $\pm$ 2,3%, 15,0 $\pm$ 1,5%, 25,0 $\pm$ 1,8% и 15,0 $\pm$ 1,3% соответственно. Количество LABA-, UEA I-положительных лимфоцитов составляло 0,90 $\pm$ 0,03% и 2,9 $\pm$ 0,2%, соответственно, а связывание с антителами к Tn- и CD43-антигенам отсутствовало. В крови больных хроническим лимфолейкозом уровни ConA-, SNA- и MAA-II-положительных лимфоцитов относительно контроля возрастали соответственно в 2,2, 3,7 и 2,6 раза. Количество LABA- и UEA I-положительных лимфоцитов повышалось в 11 ($p < 0,01$) и 23 ($p < 0,001$) раза и составило 10,5 $\pm$ 0,5% и 67,5 $\pm$ 5,5 % соответственно. Количество лимфоцитов у которых был обнаружен CD43-антиген,

возросло в 72, а Тн-антиген – в 80 раз. Под действием СОР-терапии почти наполовину был снижен уровень LABA- и UEA I-положительных лимфоцитов, на треть – МAA II-положительных клеток и лимфоцитов, взаимодействующих с антителами к CD43- и Тн антигену. Уровень PHA-L-положительных лимфоцитов в крови больных хроническим лимфолейкозом после прохождения алкилирующей терапии повысился на $18,0 \pm 2,0\%$, и почти не отличался от полученных в контрольной группе.

Выводы. У больных хроническим лимфолейкозом в лимфоцитах периферической крови изменяется структура гликоконъюгатов, проявляющаяся в усилении экспонирования L-фукози, α -маннози та N-ацетилнейрамінової кислоти, что подтверждено значительным ростом по отношению к контролю количества ConA-, SNA-, MAA-II-, LABA I-положительных клеток. У больных хроническим лимфолейкозом выявлен значительный рост количества лимфоцитов, у которых обнаружили маркеры канцерогенеза CD43- и Тн-антигены. СОР-терапия достоверно снизила уровень LABA-, UEA I- и MAA II-положительных клеток, а также частично Тн- и CD43-антиген-положительных лимфоцитов, что свидетельствует о ее положительном влиянии на лечение хронического лимфолейкоза.

Ключевые слова: В-клеточный хронический лимфолейкоз, лектины, моно- и поликлональные антитела, мембраны лимфоцитов, гликаны, гликоконъюгаты.

UDC 612.017: 577.112.577.15.616.15-07

Changes in Glycanic Determinants of Lymphocytes Membranes in Peripheral Blood in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia under Antitumor Therapy

Maslak G. S., Chernenko G. P., Baibakov V. M., Viselko A. D., Pismenetska I. Yu., Kopatska M. V., Konovalova O. S.

Abstract. The purpose of the study was to study the nature of changes in the exposure of surface glycans of peripheral blood lymphocytes in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia under conditions of antitumor therapy.

Materials and methods. We studied the features of exposure of surface glycotopes of peripheral blood lymphocytes in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia under conditions of antitumor therapy using a set of seven lectins labeled with FITC and monoclonal antibodies to Tn-antigen- FITC for the detection of Tn antigen and CD43 exposure on blood lymphocytes. Cytostatic therapy included cyclophosphamide, vincristine (oncovin), prednisolone. Data were recorded on a Beckman Coulter EPICS flow cytometer. The results were processed using FCS3 Express.

Results and discussion. The number of lymphocytes of healthy donors with a positive reaction to ConA, PHA-L, SNA, MAA-II and α 1-acid glycoprotein amounted to $16.0 \pm 3.0\%$, $23.0 \pm 2.3\%$, $15.0 \pm 1.5\%$, $25.0 \pm 1.8\%$ and $15.0 \pm 1.3\%$, respectively. The number of LABA-, UEA I-positive lymphocytes was $0.90 \pm 0.03\%$ and $2.9 \pm 0.2\%$, respectively, and there was no binding to antibodies to Tn- and CD43-antigens. In the blood of patients with chronic lymphocytic leukemia, the level of ConA-, SNA- and MAA-II-positive lymphocytes increased relative to control by 2.2, 3.7 and 2.6 times, respectively. The number of LABA- and UEA I-positive lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia increased by 11 ($p < 0.01$) and 23 ($p < 0.001$) times and amounted to $10.5 \pm 0.5\%$ and $67.5 \pm 5.5\%$ respectively. The number of lymphocytes with CD43 antigen on their surface increased by 72 times, and the Tn antigen increased by 80 times. Cytostatic therapy reduced the level of LABA- and UEA I-positive lymphocytes by almost half, and MAA II-positive cells and lymphocytes interacting with antibodies to CD43 and Tn antigen by a third. The level of PHA-L-positive lymphocytes in the blood of chronic lymphocytic leukemia patients after undergoing alkylating therapy increased by $18.0 \pm 2.0\%$ and almost did not differ from those obtained in the control group.

Conclusion. 1. In chronic lymphocytic leukemia patients, the structure of glycoconjugates in peripheral blood lymphocytes changes, manifested in increased exposure of L-fucose, α -mannose and N-acetylneuraminic acid, which is confirmed by a significant increase in relation to the control of the number of ConA-, SNA-, MAA-II-, LABA I-positive cells.

2. Patients with chronic lymphocytic leukemia showed a significant increase in the number of lymphocytes, in which the markers of carcinogenesis CD43 and Tn antigens were found.

3. Cytostatic therapy significantly reduced the level of LABA-, UEA I- and MAA II-positive cells, as well as partially Tn- and CD43-antigen-positive lymphocytes, which indicates its positive effect on the treatment of chronic lymphocytic leukemia

Keywords: B-cell chronic lymphocytic leukemia, lectins, mono- and polyclonal antibodies, lymphocyte membranes, glycans, glycoconjugates.

ORCID and contributionship

Ganna S. Maslak : 0000-0003-3573-8606 ^{A,B,D,F}

Galina P. Chernenko : 0000-0001-9340-6269 ^{A,D,E,F}

Vladimir M. Baibakov : 0000-0001-8632-103X^{A,E}

Andrey D. Viselko : 0000-0002-8347-4310 ^{C,E}

Iryna Yu. Pismenetska : 0000-0002-5223-0903 ^{C,E}

Mariya V. Kopatska : 0000-0003-1760-2617 ^{C,D,E}

Helena S. Konovalova : 0000-00017816-1320 ^{B,C,D}

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,

C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,

E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR**Galina P. Chernenko**

Dnipro Medical Institute Traditional and Non-traditional Medicine

Department of Fundamental Disciplines

17, Sevastopolskaya St., Dnipro 49001, Ukraine

tel: +380968169694, e-mail: golem0104@gmail.com

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 03.11.2021 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування