

С.В. Гоголь
Ю.В. Яніш
С.П. Залеток
Т.С. Іванівська

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: лейкоз, активність/експресія аргінази, діагностика.

АКТИВНІСТЬ ТА ЕКСПРЕСІЯ АРГІНАЗИ В КЛІТИНАХ КРОВІ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ЛЕЙКОЗІВ

Мета: дослідити активність/експресію аргінази у клітинах периферичної крові хворих на різні форми лейкозу. **Об'єкт і методи:** визначення активності аргінази проведено в лімфоцитах периферичної крові хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз (71 хворий); гострий мієлоїдний лейкоз (53 хворих); В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (8 хворих); неходжкінські лімфоми (30 хворих) та в лімфоцитах 10 донорів. У клітинних екстрактах лімфоцитів хворих досліджено рівні експресії білка аргінази. **Результати:** встановлено, що рівні експресії білка аргінази, як і показники активності цього ферменту, були найвищими у лімфоцитах хворих на В-клітинний хронічний лімфолейкоз. Найнижчі рівні активності аргінази виявлено у фракції бластних клітин хворих на В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз. **Висновок:** визначення рівнів активності/експресії аргінази у клітинах периферичної крові може бути запропоновано в якості додаткових критеріїв для уточненої діагностики окремих форм лейкозів.

Аргіназа (L-аргінін-аміногідролаза, К.Ф.3.5.3.1) є ферментом синтезу поліамінів (ПА) — путресцину, спермідину і сперміну, які задіяні в процесах росту, проліферації та диференціації клітин. Аргіназа каталізує гідроліз L-аргінину до L-орнітину і сечовини. З L-орнітину за участю орнітиндекарбоксілази (ОДК) утворюється попередник сперміну і спермідину — путресцин. Вперше аргіназа була виявлена в печінці ссавців як термінальний фермент циклу сечовини. В інших тканинах, які позбавлені повного метаболізму сечовини, також проявляється аргіназна активність. У цьому випадку важливість аргінази може полягати, зокрема, у продукції орнітину для синтезу ПА. Є дані, які свідчать, що у тканинах раку шлунка, стравоходу, легені активність аргінази (АА) суттєво вища порівняно з нормальними тканинами [1]. У доступній літературі відомі нечисленні дослідження, згідно з якими для злоякісно трансформованих клітин периферичної крові при певних формах лейкозів у людини та тварин характерні зміни метаболізму ПА, у тому числі й АА. Так, М.М. Ahmed і співавтори [2] виявили підвищення АА у пацієнтів із хронічним мієлолейкозом (ХМЛ), резистентним до терапії. Згідно з даними L. Koparska та співавторів [3], при хронічному лімфолейкозі АА у лейкоцитах клітинах удвічі нижча за цей показник у лімфоцитах здорових донорів.

Описано також результати дослідження щодо змін активності та експресії інших ферментів метаболізму ПА при злоякісних хворобах крові у тварин і людини. Зокрема, А.К. Tripathi і співавтори [4] виявили значне підвищення рівня активності ОДК у мононуклеарах крові при ХМЛ порівняно з активністю ферменту у здорових людей-донорів. Ці самі дослідники встановили наявність значно вищих рівнів активності ОДК у клітинах у фазі ак-

селерації ХМЛ порівняно з показниками у хронічній фазі захворювання. Також вищою активність ферменту була у пацієнтів, у яких хвороба протягом декількох місяців переходила у фазу акселерації, порівняно з хворими, у яких прогресування не відбувалося. Автори цієї роботи вважають, що активність ОДК відображає проліферативну активність неопластичних клітин і може слугувати додатковим прогностичним маркером у хворих на ХМЛ. У роботі S. Pirnes-Karhu і співавторів [5] продемонстровано, що гіперекспресія одного з ферментів катаболізму ПА — спермідин-/спермін-ацетилтрансферази — у мієлоїдних клітинах кісткового мозку та їх мікрооточенні у мишей зумовлює виникнення у тварин мієлопроліферативних захворювань.

Метою роботи було дослідити активність та експресію аргінази в клітинах периферичної крові хворих на різні форми лейкозу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

АА досліджено в загальному пулі лімфоцитів (ЗПЛ) і у фракції В-лімфоцитів 10 здорових донорів, 71 хворого на В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ), 53 хворих на гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ), серед яких були такі варіанти: ГМЛ М5 — 32 хворих, ГМЛ М4 — 12 хворих, ГМЛ М1 — 6 хворих; ГМЛ М2 — 2 хворих; ГМЛ М3 — 1 хворий; 8 хворих на В-клітинний гострий лімфобластний лейкоз (В-ГЛЛ), 30 хворих на неходжкінські лімфоми (НХЛ), у більшості з яких була діагностована В-лімфома з малих лімфоцитів. Вік обстежених хворих — від 21 до 89 років. Діагноз за морфологічними, цитохімічними та імуноцитохімічними критеріями тих чи інших форм гемобластозів був верифікований у відділі онкогематології Інституту експериментальної пато-

логії, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького (завідувач — професор Д.Ф. Глузман) [6]. Хворі були проінформовані щодо мети проведення досліджень і надали згоду на використання свого клінічного матеріалу в наукових цілях.

Клітини крові хворих на гемобластози (до початку лікування) і донорів виділяли центрифугуванням в щільності градієнта фікол-верографіну зі зразків периферичної крові, що попередньо відстоювалася до осідання еритроцитарної маси (1500 об./хв, 40 хв, діаметр бакет-ротора 18 см; щільність градієнта 1,076–1,078 г/см³). Виділену фракцію використовували для подальших біохімічних досліджень. В-лімфоцити отримували із загального пулу мононуклеарів шляхом видалення спонтанно утворених Є-розеток, нехтуючи незначною домашню моноцитів у кінцевій суспензії. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва. Фракція лімфоцитів хворих на В-ХЛЛ містила приблизно 86% трансформованих В-лімфоцитів, хворих на ГМЛ — 70–80% мієлоїдних бластів, хворих на В-ГЛЛ — 38–90% бластів.

АА в лімфоцитах визначали методом [7] і виражали в мкМоль виробленої сечовини/(25 • 10³ клітин • год).

Для визначення рівня експресії білка аргінази І (Arg I) застосовували методи гель-електрофорезу та Western blotting аналізу білкових препаратів (екстрактів клітин), денатурованих за допомогою SDS, визначення проводили за модифікованою методикою Леммлі [8]. Використано антитіла: Arg I mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, США); кон'югати: Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP. Екстракти готували згідно з методом Sovak [9]. Визначення концентрації загального білка в зразках проводили за допомогою методу Бредфорда [10]. Дані Western blotting аналізу були математично оброблені за допомогою комп'ютерної програми TotalLab. Статистичну обробку отриманих результатів проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента. Достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведеного дослідження показали, що рівень АА у фракції субстратних клітин пацієнтів з різними формами лейкозу на 15,7–51,8% вищий порівняно з показниками активності ферменту у ЗПЛ донорів та на 38,9–82,2% — з показниками АА у В-лімфоцитах донорів (таблиця).

Найвищою АА була в лімфоцитах хворих на В-ХЛЛ та становила $1,64 \pm 0,02$ мкМоль/25 • 10³/год, що майже на 52% перевищує активність ферменту в ЗПЛ та на 82,2% — у В-лімфоцитах донорів.

При НХЛ АА становила $1,53 \pm 0,01$ мкМоль/25 • 10³/год, що на 41,7 та 70,0% вище значень у ЗПЛ та В-лімфоцитах відповідно у здорових людей і дещо менше, ніж при В-ХЛЛ. Рівні АА при ГМЛ (М5, М4, М1–3) не мали достовірних відміннос-

тей між собою, але були достовірно нижчими, ніж при В-ХЛЛ і НХЛ, та вищими порівняно з показниками донорів. АА у хворих на В-ГЛЛ становила $1,25 \pm 0,05$ мкМоль/25 • 10³/год і була найнижчою у пацієнтів із дослідженими формами лейкозів. Водночас активність ферменту у хворих на В-ГЛЛ на 15,7 і 38,9% перевищувала аналогічні показники ЗПЛ і фракції В-лімфоцитів периферичної крові здорових людей (див. таблицю).

Таблиця

Рівень АА у лімфоцитах периферичної крові донорів та пацієнтів із різними формами лейкозу

Субстратні клітини	АА, мкМоль/25 • 10 ³ /год	Підвищені (%) рівні АА у лімфоцитах хворих порівняно з показниками донорів	
		ЗПЛ донорів	В-лімфоцити донорів
ЗПЛ донорів	$1,08 \pm 0,04$	—	—
В-лімфоцити донорів	$0,90 \pm 0,04$	—	—
В-ХЛЛ	$1,64 \pm 0,02^1$	51,6	82,2
НХЛ	$1,53 \pm 0,01^1$	41,7	70,0
ГМЛ М5	$1,34 \pm 0,03^{1,2}$	24,1	48,9
ГМЛ М4	$1,32 \pm 0,03^{1,2}$	22,2	46,7
ГМЛ М1–М3	$1,38 \pm 0,02^{1,2}$	27,8	53,3
В-ГЛЛ	$1,25 \pm 0,05^{1,2}$	15,7	38,9

* $p < 0,05$ — порівняно з ЗПЛ та В-лімфоцитами донорів.

** $p < 0,05$ — порівняно з пацієнтами з В-ХЛЛ та НХЛ.

Експресію білка Arg I досліджували лише у пацієнтів з В-ХЛЛ, НХЛ та ГМЛ М5, тобто в найбільш численних групах хворих у нашому дослідженні (рисунк).

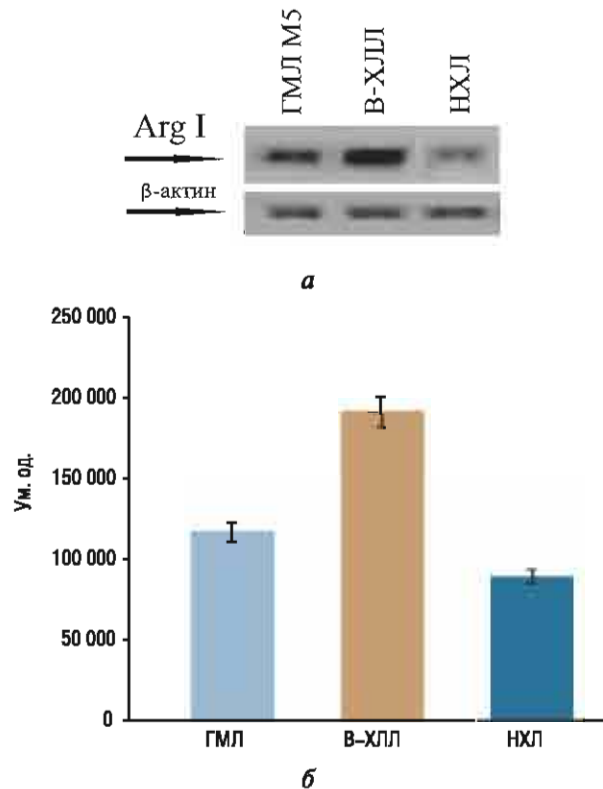


Рисунок. Рівень експресії білка Arg I в лімфоцитах периферичної крові пацієнтів із ГМЛ, В-ХЛЛ та НХЛ: а — дані Western blotting аналізу; б — розрахунок за допомогою програми TotalLab

Як видно з даних, представлених на рисунку, рівні експресії Arg I, як і показники активності ферменту (див. таблицю), найвищі у лімфоцитах хворих на В-ХЛЛ. Однак співвідношення рівнів експресії білка Arg I при НХЛ та ГМЛ виявилось протилежним показнику для рівнів загальної АА, котра, як відомо, у цільноклітинних гомогенатах може бути зумовлена не лише цитоплазматичним ферментом Arg I, але й мітохондріальним білком аргінази II (Arg II). Можна припустити, що вміст білка Arg II може бути вищим у фракції субстратних клітин хворих на ГМЛ (що містить 70–80% бластів) порівняно з хворими на НХЛ. Це припущення узгоджується з даними F. Mussai та співавторів [11], які виявили, що в бластах хворих на ГМЛ експресується Arg II. Фермент надходить у плазму крові та за рахунок посилення обміну аргініну змінює імунне мікросередовище і бере участь у пригніченні проліферації Т-клітин. Ці самі дослідники продемонстрували аргіназозалежну здатність бластів пацієнтів із ГМЛ видозмінювати навколишні моноцити з набуттям супресивного M2-подібного фенотипу. Крім того, показано, що бласти при ГМЛ можуть пригнічувати проліферацію та диференціювання попередників гранулоцитів-моноцитів миші та попередників CD34⁺ людини. Також виявлено, що імуносупресивна активність бластів при ГМЛ може бути модульована за допомогою інгібіторів аргінази, що свідчить про можливу нову терапевтичну мішень при ГМЛ [12].

Ураніше проведених дослідженнях ми визначали рівні ПА (путресцину, спермідину, сперміну) у клітинах пацієнтів з В-ХЛЛ та ГМЛ M5 [13]. Показано, що АА не мала достовірної кореляції з вмістом ПА. Хоча часткові кореляції між сумарною кількістю ПА та кожним з окремих ПА при введенні до розрахунку параметра АА були достовірно вищими за відповідні парні кореляції. Це свідчить про незначну, але все ж не нульову роль аргіназного шляху продукції орнітину (попередника путресцину і через нього — спермідину і сперміну) у синтезі ПА у субстратних клітинах, зокрема у хворих на В-ХЛЛ та ГМЛ M5. Це певною мірою узгоджується з даними J.L. Deignan і співавторів [14], які показали, що ендогенна аргіназа безпосередньо не впливає на гомеостаз ПА в організмі мишей, нокаутних за Arg I та Arg II, а екзогенні джерела орнітину і власне ПА відіграють більш значну роль у формуванні рівня ПА.

ВИСНОВКИ

1. Загальна АА у фракції клітин периферичної крові при всіх досліджених формах лейкозу достовірно вища, ніж у здорових людей.
2. Загальна АА та експресія білка Arg I у фракції лімфоцитів периферичної крові хворих на В-ХЛЛ достовірно вищі порівняно з клітинами при інших досліджених формах лейкозів.
3. Співвідношення експресії білка Arg I між різними формами лейкозу можуть відрізнятися

(аж до протилежного знаку) від відповідних співвідношень загальної АА в нормі, що можна гіпотетично віднести на рахунок мітохондріального ферменту Arg II.

4. Показник загальної АА клітин лімфоцитарної фракції периферичної крові хворого може бути рекомендований як додатковий критерій для уточненої діагностики В-ХЛЛ.

ПОДЯКА

Висловлюємо щирю подяку співробітникам відділу онкогематології ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України і особисто — завідувачу відділу, професору Д.Ф. Глузману за люб'язно надані зразки крові пацієнтів і консультативну підтримку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Akram J, Mahmoud A, Hamid-Reza R. Rhodanese and arginase activity in normal and cancerous tissues of human breast, esophagus, stomach and lung. *Arch Iran Med* 2001; 4: 88–92.
2. Ahmed MM, Said ZS, Montaser SA. Chronic myelogenous leukemia: cytogenetic and biochemical consequences and applications for diagnosis and judgment. *J Cytol Histol* 2014; S4:2. doi: DOI: 10.4172/2157-7099: 4–15.
3. Konarska L, Widzynska I, Zienkiewicz H, Sulek K. Arginase activity alterations in peripheral blood lymphocytes in the human chronic lymphocytic leukemia. *Acta Biochim Polonica* 1993; 40 (1): 160–3.
4. Tipathi AK, Chaturvedi R, Ahmad R, et al. Peripheral blood leukocytes ornithine decarboxylase activity in chronic myeloid leukemia patients: prognostic and therapeutic implications. *Leukemia Res* 2002; 26 (2): 349–54.
5. Pirnes-Karhu S, Mantymaa P, Sironen R, et al. Enhanced polyamine catabolism disturbs hematopoietic lineage commitment and leads to a myeloproliferative disease in mice overexpressing spermidine/spermine N¹-acetyltransferase. *Amino Acids* 2014; 46 (3): 689–700.
6. Gluzman DF, Sklyarenko LM, Nadgornaya VA. *Diagnosics oncohematology*. Kyiv, DIA 2011. 256 с.
7. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 1994; 174 (1–2): 231–5.
8. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–5.
9. Sovak M, Bellas R, Kim D, et al. Aberrant nuclear factor-kB/Rel expression and pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997; 100: 2952–60.
10. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.
11. Mussai F, De Santo C, Abu-Dayyeh I, et al. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* 2013; 122 (5): 749–58.
12. Mussai F, Egan S, Higginbotham-Jones J, et al. Arginine dependence of acute myeloid leukemia blast proliferation: a novel therapeutic target. *Blood* 2015; 125 (15): 2386–96.
13. Orlovsky OA, Klenov OO, Bentrud VV, et al. Certain features of polyamine metabolism and pathogenetic functions in the mononuclear cells of the patients with chronic B-lymphocytic leukemia and acute monoblastic leukemia (M5). *Clin oncol* 2018; 4 (32): 45–51.
14. Deignan JL, Livesay JC, Shantz LM, Grody WW. Polyamine homeostasis in arginase knockout mice. *AJP Cell Physiol* 2007; 293 (4): 1296–301.

**ARGINASE ACTIVITY AND EXPRESSION
IN THE PERIPHERAL BLOOD CELLS
OF PATIENTS WITH THE DIFFERENT
FORMS OF LEUKEMIA**

*S.V. Gogol, Yu.V. Yanish, S.P. Zaletok,
T.S. Ivanivska*

*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Kyiv, Ukraine*

Summary. *Objective:* to study arginase activity/expression in the peripheral blood cells of patients with the different forms of leukemia. **Object and methods:** arginase activity was measured in the peripheral blood lymphocytic fraction of patients with B-cell chronic lymphoid leukemia (71 patient); different kinds (M1–M5) of acute myeloid leukemia (53 patients); B-cell acute lymphoid leukemia (8 patients); different forms of non-Hodgkin's lymphoma (30 patients) and 10 donors. Also, there was measured Arg I protein expression in the cellular extracts

of the same blood fraction. **Results:** arginase activity of the B-cell chronic lymphoid leukemia patients' lymphocytes was found to be significantly highest between all patients been studied. The lowest arginase activity was found in the lymphocytic fraction of the B-cell acute lymphoid leukemia patients. **Conclusion:** measurement of the arginase activity/expression in the peripheral blood lymphocytic fraction may be proposed as a supplement criterion to specify diagnosis of some forms of leukemia.

Key Words: leukemia, arginase activity/expression, diagnosis.

Адреса для листування:

ГОГОЛЬ С.В.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького
НАН України
E-mail: tantattoo72@gmail.com

Одержано: 30.11.2018