

С.П. Залеток
О.В. Кленов
В.В. Бентрад
Ю.В. Яніш
С.В. Гоголь
С.В. Коваль
Л.М. Склярєнко

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

Ключові слова: лімфоїдні
новоутворення, поліаміни,
ферменти синтезу поліамінів,
діагностика.

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЗМУ ПОЛІАМІНІВ У ТРАНСФОРМОВАНИХ КЛІТИНАХ КРОВІ ХВОРИХ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ЛЕЙКЕМІЇ

Поліаміни (ПА) — спермін, спермідин, путресцин — відіграють важливу роль у процесах проліферації, росту та диференціювання нормальних та злоякісних клітин. Зокрема, різноманітні порушення метаболізму ПА було виявлено при розвитку як експериментальних пухлин, так і при певних онкологічних захворюваннях. Водночас порушення метаболізму ПА при онкогематологічних захворюваннях людини вивчені недостатньо. **Мета:** оцінити можливість використання показників обміну ПА для уточненої діагностики та прогнозу перебігу різних форм лейкемії. **Об'єкт та методи:** дослідження проведено на клінічному матеріалі (мононуклеари периферичної крові (МПК)) 225 хворих з різними формами і цитологічними варіантами лейкозів (В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) — 82, гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ М1–М5) — 65, гострі В- і Т-лімфобластні лейкози — 48, неходжкінські лімфоми — 30 хворих) та 10 практично здорових донорів. Виділення фракції МПК виконували методом центрифугування у градієнті фікол-урографіну. У роботі використано методи рідинної хроматографії високого тиску, гель-електрофорезу, Western blotting, методи статистики. **Результати:** у МПК хворих з різними формами лейкозів виявлено значну варіабельність як активності аргінази, так і експресії її білка. Активність/експресія аргінази були найвищими у хворих на В-ХЛЛ, а найнижчі показники характерні для фракції бластних клітин хворих на гострий В-лімфобластний лейкоз. Активність аргінази у МПК хворих з різними формами лейкозів була значно нижчою, у порівнянні з такою у лімфоцитах здорових людей. Встановлено, що для МПК хворих на В-ХЛЛ характерні низькі рівні експресії орнітиндекарбоксилази (ОДК), високі рівні сперміну і низькі значення показника співвідношення спермідин/спермін у порівнянні з хворими на гострі лейкози. Показано, що рівні ПА та індекс спермідин/спермін в МПК різних груп хворих на неходжкінські лімфоми суттєво відрізняються. Для МПК хворих на В-лімфому мантійної зони без лейкемізації процесу характерними були: низький рівень експресії ОДК, путресцину і значення спермідин/спермін та високий рівень сперміну. За наявності процесу лейкемізації рівні експресії ОДК, путресцину, спермідину та значення індексу спермідин/спермін були у 3–9 разів вищими. Найвищі рівні експресії ОДК, путресцину та значення спермідин/спермін виявлені у хворих на Т-лімфобластний лейкоз/лімфому та В-пролімфоцитарний лейкоз. **Висновки:** рівні активності/експресії аргінази і ОДК, сперміну, спермідину, путресцину та показник співвідношення спермідин/спермін можуть бути використані як додаткові маркери для уточненої діагностики різних цитологічних варіантів лейкозу та визначення прогнозу перебігу захворювання.

Поліаміни (ПА) — позитивно заряджені аміни, що містяться у клітинах всіх організмів. До основних ПА, що продукуються у клітинах ссавців, належать путресцин, спермідин та спермін. Внутрішньоклітинні рівні ПА залежать від активності їх біосинтетичних та катаболічних ферментів, а також від статусу поліамінних транспортерів. Біосинтез цих поліамінів

контролюється орнітиндекарбоксилазою (ОДК), S-аденозилметионіндекарбоксилазою (S-АМДК), спермідинсинтазою та спермінсинтазою, а деградація — N1-спермідин/спермін-ацетилтрансферазою (ССАТ), поліаміноксидазою (ПАО) та сперміноксидазою (СМО) [1]. На рис.1 представлено схему метаболізму ПА.

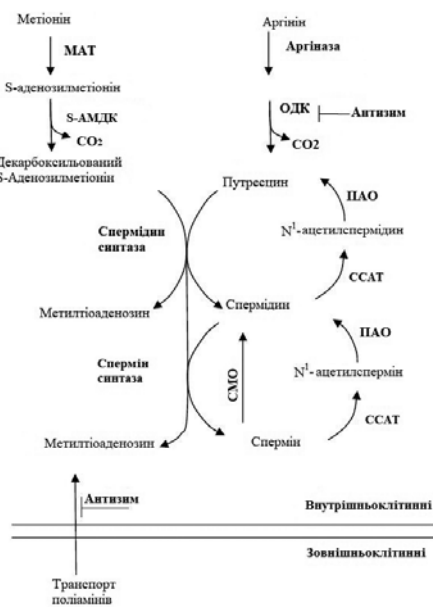


Рис. 1. Схема метаболізму поліамінів

У світовій літературі є безліч даних про роль ПА у регуляції процесів проліферації та росту, диференціації та спеціалізації клітин, їх виживання або загибелі (апоптоз). Різноманітні порушення метаболізму ПА відіграють важливу роль у таких патологічних процесах, як дисдиференціація та малігнізація, ріст та прогресія пухлин, запалення, імунологічна реактивність та ін. [2].

У більшості ракових клітин спостерігається висока активність ферментів синтезу ПА (орнітин-декарбоксилази (ОДК) та S-АМДК) та високі рівні путресцину і спермідину, що сприяє проліферації та злоякісній трансформації клітин [1, 3]. Однак те, як ракові клітини активують цей метаболічний шлях, і молекулярні ознаки, що стоять за онкогенною дією ПА, дотепер головним чином залишаються до кінця незрозумілими.

Онкогематологічні хвороби людини належать до групи захворювань, за яких порушення метаболізму ПА вивчені недостатньо. У той же час досить широко досліджували метаболізм ПА в лейкоемічних клітинах під час розвитку перещеплених лейкоемічних штамів у експериментальних тварин та вивчали вплив інгібіторів обміну ПА на ріст таких пухлин *in vivo*. Зокрема, нами було показано, що різні штами експериментальних пухлин, у тому числі лімфоїдні лейкози у мишей, відрізняються між собою за чутливістю до інгібіторів ферментів синтезу ПА та комбінацій таких інгібіторів [1, 4].

Що стосується вивчення ролі ПА та ферментів їх метаболізму в лейкомічних клітинах людини, то у наявних публікаціях містяться лише фрагментарні відомості з цього питання і бракує даних щодо можливості використання показників обміну ПА як маркерів для уточненої диференціальної діагностики лейкемій, хоча деякі дослідження в цьому напрямку вже проведено [5–8]. Виявлено, що у фракції мононуклеарів периферичної крові (МПК) пацієнтів з лейкемією підвищено вміст ПА та його метаболітів.

ентів із хронічним мієлолейкозом (ХМЛ) активність ОДК достовірно перевищує аналогічний показник практично здорових людей [5]. У МПК хворих на ХМЛ у фазі акселерації активність ОДК суттєво підвищувалася порівняно з такою у пацієнтів із ХМЛ у хронічній фазі. Високі показники ОДК було виявлено у пацієнтів, хвороба яких протягом 24 міс прогресувала і переходила у фазу акселерації порівняно з особами без прогресії захворювання. Автори цієї роботи вважають, що активність ОДК відображає проліферативну активність клітин і може слугувати додатковим прогностичним маркером ХМЛ [5]. Виявлено, що висока активність ССАТ корелює з кількістю лейкемічних клітин при мієлоїдних формах лейкемії, тоді як у разі лімфоїдних форм такої кореляції не спостерігали [6]. Показано, що для моноклеарів пацієнтів з резистентним до хіміотерапії ХМЛ характерна висока активність І ферменту синтезу ПА — аргінази [7]. На противагу цьому, за даними інших авторів, у пацієнтів з В-клітинним хронічним лімфолейкозом (В-ХЛЛ) активність аргінази у МПК була вдвічі нижчою, ніж у В-лімфоцитах у нормі. Протилейкемічна терапія сприяла нормалізації аргіназної активності [8].

Іншим перспективним напрямком досліджень ПА при злоякісних захворюваннях кровотвірної та лімфоїдної систем є вивчення можливостей застосування нових ефективних препаратів (на основі інгібіторів синтезу ПА та їх аналогів) для лікування хворих на лейкемію. Незважаючи на брак даних щодо особливостей метаболізму ПА у лейкозних клітинах різного генезу людини, уже є деякий позитивний досвід терапії пацієнтів з лейкозами із застосуванням інгібіторів біосинтезу ПА, зокрема, α -диформетилорнітину та метил-глюксаль(біс) гуанілгідразону [9].

Було проведено також передклінічні та клінічні випробування інгібіторів різних стадій біосинтезу ПА, аналогів ПА, або поліамінів, ковалентно сполучених з протилейкемічними лікарськими препаратами задля їх цільової доставки в лейкемічні клітини через систему активного транспорту ПА [10]. Ці дослідження показали обнадійливі результати і наразі продовжуються, зокрема у Франції, Великій Британії та Швейцарії.

Логічно припустити, що для досягнення більш істотного успіху потрібно розуміти специфічні особливості метаболізму ПА при різних формах лейкозів. Для ефективної протипухлинної дії інгібіторів обміну ПА або їх аналогів вкрай необхідні знання метаболізму ПА в лейкозній клітині, оскільки в трансформованих клітинах при різних формах захворювання та різній агресивності процесу характер змін метаболізму ПА може істотно відрізнятись. Результати дослідження обміну ПА в клітинах хворих на різні форми лімфолейкемії можуть бути використаними як для уточненої диференціальної діагностики цих патологічних процесів і, тим самим, для індивідуалізації протилейкемічної терапії. Тільки такі знан-

ня, на нашу думку, можуть забезпечити успіх у лікуванні з застосуванням препаратів, мішенню для яких є ті чи інші ланки метаболізму ПА.

Метою цього дослідження було оцінити можливість використання показників обміну ПА для уточненої діагностики та прогнозу перебігу різних форм лейкомії.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

На клінічному матеріалі (фракція МПК) 225 хворих з різними формами і цитологічними варіантами лейкозу (В-клітинний хронічний лімфолейкоз (В-ХЛЛ) — 82, гострий мієлоїдний лейкоз (ГМЛ М1–М5) — 65, гострі В- і Т-лімфобластні лейкози (В- і Т-ГЛЛ) — 48, неходжкінські лімфоми (НХЛ) — 30 хворих) та 10 практично здорових людей (донорів) досліджено активність/експресію ферментів синтезу ПА (аргінази та ОДК), а також рівні ПА.

Вік обстежених хворих — 21–89 років. Діагнози за морфологічними, цитохімічними та імуноцитохімічними критеріями було верифіковано у відділі онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького Національної академії наук України (завідувач відділу — професор Д.Ф. Глузман) [11]. Хворих було поінформовано щодо мети проведення досліджень і вони надали згоду на використання клінічного матеріалу в наукових цілях.

З периферичної крові пацієнтів класичним методом центрифугування у градієнті фікол-урографіну ($d=1,076-1,078$ г/см³) виділяли фракцію МПК, яка містила у хворих на В-ХЛЛ приблизно 86,0% трансформованих В-лімфоцитів, у хворих на ГМЛ М5 — 70,0–80,0% монобластів, у пацієнтів з В-ГЛЛ — 38,0–90,0% бластів. Виділену фракцію використовували для подальших біохімічних досліджень. В-лімфоцити донорів отримували з МПК з використанням еритроцитів барана шляхом видалення спонтанно утворених Є-розеток, нехтуючи незначною домішкою моноцитів у кінцевій суспензії. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва.

Вміст ПА визначали методом високоефективної рідинної хроматографії за допомогою хроматографа Agilent 1200 (США) із застосуванням методу [12] з нашими модифікаціями. Для цього ПА після їх екстракції зі зразків піддавали дансилюванню за допомогою дансилхлориду. У якості стандартів служили гідрохлориди ПА виробництва Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Для визначення рівнів експресії ОДК і аргінази І застосовували методи гель-електрофорезу та Western blotting аналізу білкових препаратів (екстрактів клітин), денатурованих за допомогою SDS, визначення проводили за модифікованою методикою Леммлі [13]. Екстракти готували згідно з методом М. Sovak [14]. Визначення концентрації загального білка в зразках проводили за допомогою методу Бредфорда [15]. Дані Western blotting аналізу були математично оброблені за допомогою комп'ютерної

програми TotalLab. Активність аргінази вимірювали методом [16] і виражали в мікромолях виробленої сечовини ($25 \cdot 10^3$ клітин/год).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили, використовуючи *t*-критерій Стьюдента. Достовірними вважали розбіжності за $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідженнях активності аргінази в лейкомічно трансформованих клітинах хворих з різними формами лейкозів (В-ХЛЛ, ГМЛ М1–М5, В-ГЛЛ) і НХЛ виявили значну варіабельність як активності, так і експресії білка цього ферменту [17]. Найвищою активністю аргінази була у МПК хворих на В-ХЛЛ, а найнижчі показники активності аргінази спостерігали у фракції бластних клітин хворих на В-ГЛЛ (рис. 2). Як показано нами раніше, рівні експресії білка аргінази найвищими також були у МПК хворих на В-ХЛЛ [17]. Окрім того, рівні активності аргінази у МПК хворих з різними формами лейкозу суттєво відрізнялися від показників активності ферменту в лімфоцитах практично здорових людей та були на 16,0–52,0% нижчими, ніж у загальному пулі МПК практично здорових осіб, і на 39–82% нижчими, ніж у фракції В-лімфоцитів практично здорових осіб.

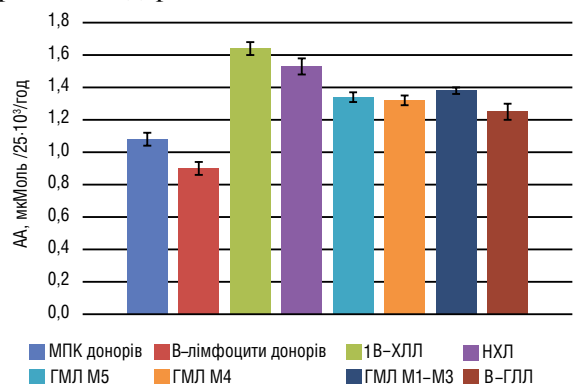


Рис. 2. Рівні активності аргінази (АА) у МПК хворих з різними формами лейкозів та у В-лімфоцитах і МПК практично здорових осіб (донорів)

Дослідження рівня експресії білка гена ОДК проведено у МПК хворих на В-ХЛЛ, ГМЛ М5 та НХЛ. Найвищі рівні експресії ОДК спостерігали в МПК хворих на ГМЛ М5 (рис. 3).

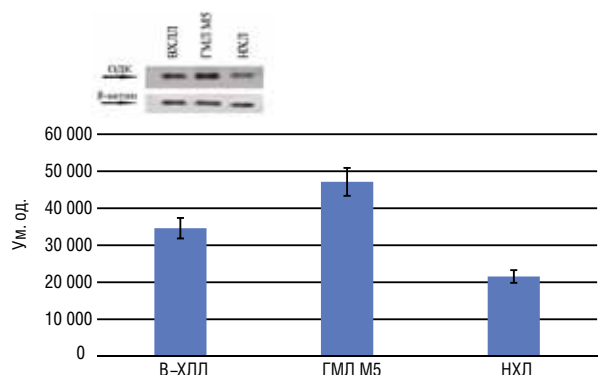


Рис. 3. Рівні експресії білка ОДК у лімфоцитах периферичної крові хворих на ГМЛ, В-ХЛЛ та НХЛ

Було також показано, що рівні експресії ОДК у МПК хворих на В-лімфому мантийної зони (В-ЛМЗ) залежали від прогресування хвороби (рис. 4). Як видно з представлених даних, для хворих на В-ЛМЗ без лейкоїзації процесу характерним був низький рівень експресії ОДК. При лейкоїзації значення експресії ОДК більш ніж у 2,4 раза перевищували показники хворих без лейкоїзації.

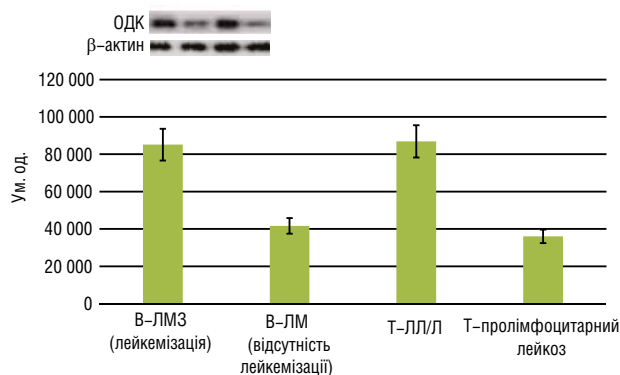


Рис. 4. Рівні експресії білка ОДК в МПК хворих з різними формами лейкозів: В-ЛМЗ; Т-лімфобластний лейкоз/лімфома (Т-ЛЛ/Л); Т-пролімфоцитарний лейкоз

Рівні експресії ОДК в МПК хворих на Т-лімфобластний лейкоз/лімфому (Т-ЛЛ/Л) були приблизно такими ж, як у хворих на В-ЛМЗ при лейкоїзації процесу. У хворих на Т-пролімфоцитарний лейкоз рівні експресії ОДК були значно нижчими, ніж у пацієнтів з Т-ЛЛ/Л, і практично не відрізнялися від значень у хворих на В-ЛМЗ за відсутності лейкоїзації.

Наступним нашим завданням було дослідити рівні ПА у трансформованих клітинах крові хворих з різними формами лейкозу та у МПК і фракції В-лімфоцитів практично здорових людей.

Достовірної різниці у рівнях ПА і співвідношенні спермідин/спермін у МПК та фракції В-лімфоцитів практично здорових людей не виявлено (табл. 1). Величина молярного співвідношення спермідину до сперміну у МПК становила $0,25 \pm 0,03$ ум.од., а у фракції В-лімфоцитів — $0,22 \pm 0,04$ ум.од.

У хворих з різними формами лейкозу рівні ПА в МПК суттєво відрізнялися. Найменші відмінності у рівнях ПА у порівнянні з донорами спостерігали у хворих з В-ХЛЛ. У пацієнтів цієї групи, порівняно з донорами, виявлено лише суттєве зниження (на 50,0%) рівня ацетильованого путресцину та

зростання на 28,0% вмісту спермідину. Вміст інших фракцій ПА (путресцину, ацетильованого спермідину та сперміну) практично не відрізнявся від контрольних значень у фракції В-лімфоцитів практично здорових осіб. Внаслідок збільшення вмісту спермідину спостерігали зростання показника молярного співвідношення спермідин/спермін ($0,31 \pm 0,03$ проти $0,22 \pm 0,02$ у практично здорових осіб; $p < 0,05$).

У МПК хворих на гострі В-лімфобластні лейкози (В-ГЛЛ), у порівнянні з хворими на В-ХЛЛ, суттєво зменшувалася кількість сперміну і ацетильований спермідин (рис. 5) та зростав показник співвідношення спермідин/спермін ($0,43 \pm 0,02$ порівняно з $0,31 \pm 0,03$ у хворих на В-ХЛЛ, $p < 0,05$).

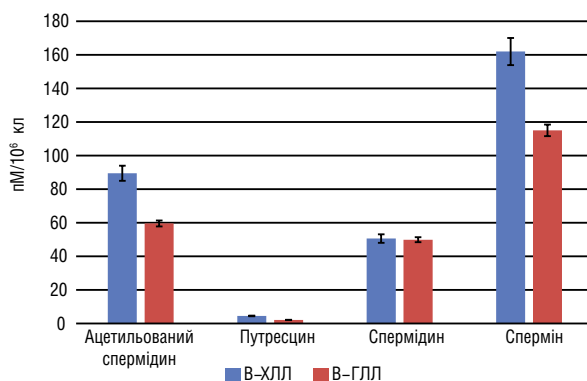


Рис. 5. Профіль ПА у МПК хворих на В-ХЛЛ та В-ГЛЛ (* $p < 0,05$)

Значну різницю у рівнях ПА спостерігали у МПК хворих на В-ГЛЛ за наявності та за відсутності коекспресії мієлоїдного антигену CD13. У хворих на В-ГЛЛ з коекспресією CD-13 відсутні ацетильовані форми путресцину і спермідину, був різко знижений рівень сперміну та високі значення показника спермідин/спермін (табл. 2).

У МПК хворих на ГМЛ М4 і М5 визначали високі рівні путресцину, спермідину, сперміну і ацетильований путресцин. Характерним для МПК хворих на ГМЛ без ознак дозрівання та з мінімальними ознаками диференціювання — ГМЛ М1-М2 була відсутність ацетильованих форм путресцину і спермідину, найнижчі серед усіх хворих на ГМЛ рівні сперміну та найвищі значення індексу спермідин/спермін (табл. 3).

Таблиця 1

Профіль ПА у МПК та фракції В-лімфоцитів практично здорових осіб, нМ/10⁶ клітин

Фракція лімфоцитів	Ацетильований путресцин	Ацетильований спермідин	Путресцин	Спермідин	Спермін
МПК	1721,0 ± 37,8	122,1 ± 12,1	5,6 ± 1,6	56,7 ± 14,4	219,3 ± 48,6
В-лімфоцити	1872,5 ± 268,9	92,2 ± 22,1	4,6 ± 1,6	36,5 ± 5,8	154,3 ± 8,0

Таблиця 2

Профіль ПА у МПК хворих на В-ГЛЛ та В-ГЛЛ з коекспресією мієлоїдного антигену CD13, нМ/10⁶ клітин

Групи	Ацетильований путресцин	Ацетильований спермідин	Путресцин	Спермідин	Спермін	Спермідин/спермін
В-ГЛЛ	26,9 ± 17,4*	59,6 ± 28,1*	2,1 ± 0,9	49,9 ± 8,6	115,3 ± 9,8*	0,43 ± 0,05*
В-ГЛЛ з коекспресією CD13	0	0	3,9 ± 1,6	63,2 ± 9,1	59,4 ± 8,2	1,06 ± 0,15

* $p < 0,05$ — у порівнянні з В-ГЛЛ з коекспресією CD13.

Профіль ПА у МПК хворих на ГМЛ, нМ/10⁶ клітин

Групи	Ацетильований путресцин	Ацетильований спермідин	Путресцин	Спермідин	Спермін	Спермідин/спермін
ГМЛ М1–М2	0	0	1,8 ± 0,4*	34,1 ± 19,1	40,9 ± 11,5*	0,83 ± 0,12*
ГМЛ М4	615,1 ± 411,4	31,9 ± 2,3*	7,2 ± 1,8	80,9 ± 7,5	188,9 ± 16,0	0,43 ± 0,10
ГМЛ М5	1549,9 ± 443,8	88,7 ± 26,3	5,9 ± 3,4	64,5 ± 9,2	130,1 ± 19,6	0,50 ± 0,06

* $p < 0,05$ – у порівнянні з ГМЛ М4 та ГМЛ М5.

Проведено порівняльний аналіз рівнів ПА у МПК хворих на НХЛ, а саме: у 9 хворих на В-ЛМЗ при лейкоїзації процесу та за відсутності лейкоїзації, 8 хворих на В-лімфому з малих лімфоцитів/В-ХЛЛ, 3 хворих на дифузну В-крупноклітинну лімфому, 7 хворих на В-пролімфоцитарний лейкоз, 3 хворих на Т-ЛЛ/Л. У хворих з різними гістологічними типами НХЛ рівні ПА у МПК суттєво відрізнялися (рис. 6).

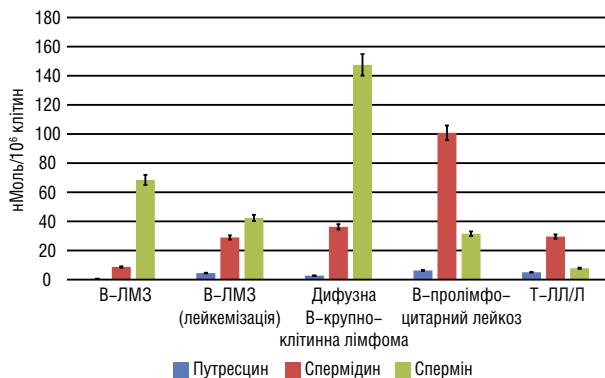


Рис. 6. Профіль ПА у МПК хворих на НХЛ

Для МПК хворих на В-ЛМЗ за відсутності лейкоїзації процесу характерним був низький рівень путресцину, високий спермін та низьке (0,13) значення показника молярного співвідношення спермідин/спермін (рис. 7).

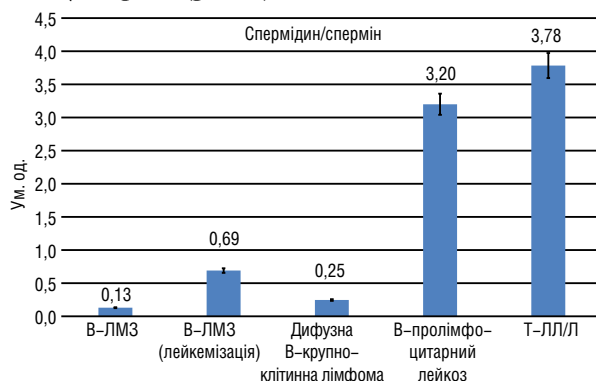


Рис. 7. Значення індексу молярного співвідношення спермідин/спермін у МПК хворих на НХЛ

У той же час за наявності лейкоїзації в МПК хворих на В-ЛМЗ рівні спермідину і путресцину були відповідно в 3,3 та 8,6 рази вищими, а рівень сперміну був знижений у 1,6 раза. Значення індексу спермідин/спермін підвищувалося до 0,69. Імовірно, що ці показники, поряд з імуноцитохімічними та іншими даними, можуть бути додатковими маркерами активзації процесу у хворих на В-ЛМЗ.

Варто зазначити, що серед обстежених хворих на НХЛ найвищі рівні путресцину, най-

нижчі рівні сперміну та найвищі значення індексу спермідин/спермін спостерігали у хворих на В-пролімфоцитарний лейкоз та Т-лімфобластний лейкоз/лімфому. Для хворих на В-пролімфоцитарний лейкоз був характерним високий лейкоцитоз ($140-150 \cdot 10^9$), а кількість пролімфоцитів становила 90,0–93,0%. У хворих на Т-лімфобластний лейкоз/лімфому також виявляли високий лейкоцитоз ($147-150 \cdot 10^9$), кількість бластів становила 67,0–70,0%.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про наявність у фракції МПК хворих з різними формами і цитологічними варіантами лейкозів значних відмінностей у системі метаболізму ПА. Аналіз отриманих даних продемонстрував, що рівні активності/експресії аргінази і ОДК, ПА (сперміну, спермідину та путресцину) та значення співвідношення спермідин/спермін можуть бути використані як додаткові маркери для уточненої діагностики різних цитологічних варіантів лейкозу. З певною обережністю також можна констатувати, що деякі показники метаболізму поліамінів можуть відображати ступінь активзації процесу і визначення їх може бути корисним для прогнозу прогресії захворювання. Зокрема, рівень експресії ОДК, рівні сперміну, спермідину, путресцину та значення індексу спермідин/спермін, поряд з імуноцитохімічними даними, можуть бути додатковими маркерами активзації хвороби у пацієнтів з В-ЛМЗ.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що активність аргінази в МПК пацієнтів при всіх досліджених формах лейкозу є достовірно вищою, ніж у практично здорових людей; активність аргінази та експресія білка аргінази в МПК хворих на В-ХЛЛ достовірно вищі у порівнянні з іншими формами лейкозів.

2. Рівні експресії ОДК у МПК хворих на В-ЛМЗ залежать від прогресування хвороби: при лейкоїзації значення експресії ОДК були більш ніж у 2,4 рази вищими у порівнянні з такими за відсутності лейкоїзації.

3. У хворих з різними формами лейкозу рівні ПА у МПК суттєво відрізнялися. Найменші відмінності у рівнях ПА порівняно з донорами спостерігали у хворих на В-ХЛЛ.

4. Встановлено, що у МПК хворих на В-ГЛЛ, у порівнянні з В-ХЛЛ, значно нижчі рівні сперміну і ацетильованого спермідину та вищі, ніж при В-ХЛЛ, значення показника спермідин/спермін.

5. Для МПК хворих на ГМЛ М4 і М5 характерні високі рівні путресцину, спермідину, сперміну і ацетильованої форми путресцину. Характер-

ним для МПК хворих на ГМЛ М1-М2 була відсутність ацетильованих форм путресцину і спермідину, найнижчі серед усіх хворих на ГМЛ рівні сперміну та найвищі значення індексу спермідин/спермін.

6. Рівні ПА та індекс спермідин/спермін у різних груп хворих на НХЛ суттєво відрізняються. Для МПК пацієнтів з В-ЛМЗ за наявності процесу лейкемізації характерні значно вищі рівні путресцину, спермідину (у 3,3 та 8,6 раза відповідно) та високий індекс спермідин/спермін, порівняно з такими за відсутності лейкемізації.

7. Найвищі рівні путресцину та найвищі показники індексу спермідин/спермін виявлено у хворих на Т-лімфобластний лейкоз/лімфому та В-пролімфоцитарний лейкоз (3,78 та 3,20 відповідно).

ПОДЯКА

Висловлюємо щиру подяку співробітникам відділу онкогематології Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології 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. **Zaletok SP.** Polyamines — markers of tumor growth and targets for anticancer therapy. DBiolSci (14.01.07) thesis. Kyiv, 2007. 37 p. (in Ukrainian).
2. **Bae D-H, Lane DJ R, Jansson PJ, Richardson DR.** The old and new biochemistry of polyamines. Biochim Biophys Acta Gen Subj 2018; **1862** (9): 2053–68.
3. **Jiajing Li, Yan Meng, Xiaolin Wu, Yuxin Sun.** Polyamines and related signaling pathways in cancer. Cancer Cell International 2020; **20**: 539–55.
4. **Zaletok SP, Berdinskikh NK, Lyalyushko NM, et al.** Effect of α -difluoromethylornithine and polyhexamethyleneguanidine — inhibitors of the polyamines biosynthesis on the kinetics of leukemia L1210 growth and the lifetime of animals. Likars'ka sprava (Vrachebnoye delo) 2005; **8**: 76–83. (in Ukrainian)
5. **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.
6. **Pirnes-Karhu S.** Spermidine/spermine N1-acetyltransferase in mouse hematopoiesis and bone remodeling and in human leukemias. Dis in Health Sciences. University of Eastern Finland, Tampere 2013: 1–73.
7. **Ahmed MM, Said ZS, Montaser SA.** Chronic myelogenous leukemia: cytogenetic and biochemical consequences and applications for diagnosis and judgment. J Cytol Histol 2014; **S4**: 015. doi: 10.4172/2157-7099.S4-015.
8. **Konarska L, Widzyska 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.
9. **Arruabarena-Aristorena A., Zabla-Letona A., Carracedo A.** Oil for the cancer engine: the cross-talk between oncogenic signaling and polyamine metabolism. Science Advances 2018; **4** (1): 2606–17.
10. **Boyé P, Floch F, Serres F, et al.** Randomized, double-blind trial of F14512, a polyamine-vectorized anticancer drug, compared with etoposide phosphate, in dogs with naturally occurring lymphoma. Oncotarget 2020; **11** (7): 671–86.
11. **Gluzman DF, Sklyarenko LM, Koval SV, et al.** Diagnostics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Kyiv: DIA, 2017: 64 p. (in Ukrainian)
12. **Gerbaut L.** Determination of erythrocytic polyamines by reversed-phase liquid chromatography. Clin Chem 1991; **37** (12): 2117–20.
13. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; **227**: 680–5.
14. **Sovak M, Bellas R, Kim D, et al.** Aberrant nuclear factor- κ B/Rel expression and pathogenesis of breast cancer. J Clin Invest 1997; **100**: 2952–60.
15. **Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annal Biochem 1976; **72**: 248–54.
16. **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.
17. **Gogol SV, Yanish YuV, Zaletok SP, Ivanivska TS.** Arginase activity and expression in the peripheral blood cells of patients with the different forms of leukemia. Oncology 2018; **20** (4): 265–8 (in Ukrainian).

PECULIARITIES OF POLYAMINE METABOLISM IN TRANSFORMED BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH DIFFERENT FORMS OF LEUKEMIA

S.P. Zaletok, O.O. Klenov, V.V. Bentrad, Y.V. Yanish, S.V. Gogol, S.V. Koval, L.M. Sklyarenko

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

Summary. Polyamines (PA) — spermine, spermidine, and putrescine — play an important role in the processes of proliferation, growth, and differentiation in normal and malignant cells. In particular, various disorders of PA metabolism were found during the development of both experimental tumors and human cancer. At the same time, disorders of PA metabolism in human oncohematological diseases are extremely poorly studied. **Aim:** to evaluate the possibility of exploiting indicators of PA metabolism for the accurate diagnosis and course prediction of various forms of leukemia. **Object and methods:** the research was conducted on clinical material (peripheral blood mononuclear cells — PBMC) of 225 patients with various forms and cytological variants of leukemia (chronic B-lymphocytic leukemia (B-CLL) — 82; acute myeloid leukemia (AML M1-M5) — 65; acute B- and T-lymphocytic leukemia — 48; non-Hodgkin's lymphoma — 30 patients) and healthy 10 donors. The isolation of PBMC lymphocytes was performed by centrifugation in a Ficoll-Urografin gradient. The high-pressure liquid chromatography, gel electrophoresis, Western blotting and statistical methods were used in the research. **Results:** significant variability in both arginase activity and its protein expression was found in the PBMC of patients with various forms of leukemia. Arginase activity/expression was the highest in patients with B-CLL; the lowest values were characteristic of the blast cell fraction of patients with B-acute lymphoblastic leukemia. The arginase activity

in the PBMC of patients with various forms of leukemia was significantly lower compared to that of healthy donor lymphocytes. It was found that the PBMC of patients with B-CLL is characterized by low levels of ornithine decarboxylase (ODC) expression, high level of spermine and low values of the spermidine/spermine (spermidine/spermine) ratio compared to patients with acute leukemia. It was shown that the levels of PA and spermidine/spermine ratio in the PBMC of different groups of patients with non-Hodgkin's lymphoma differ significantly. The PBMC of patients with mantle cell lymphoma without signs of leukemia were characterized by low expression of ODC, putrescine and the spermidine/spermine ratio and high level of spermine. In the case of leukemic activity, the expression of ODC, putrescine, spermidine and spermidine/spermine ratio were 3–9 times higher. The highest levels of expression of ODC, putrescine and spermidine/spermine ratio were found in patients with T-lymphoblastic leukemia/lymphoma and B-

*prolymphocytic leukemia. **Conclusions:** activity/expression levels of arginase, ODC, spermine, spermidine and putrescine as well as spermidine/spermine ratio can be used as additional markers for the accurate diagnosis of various cytological variants of leukemia and the disease course prognosis.*

Key Words: lymphoid tumors, polyamines, polyamine synthesis enzymes, diagnostics.

Адреса для листування:

Залєток С.П.

Київ, 03022, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: sophiazaletok@ukr.net

Одержано: 3.06.2021