

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОТОПОГРАФИИ ЛИМФОЦИТОВ И КЛЕТОК СТРОМЫ С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПАЦИЕНТОВ С В-ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Аникаева М.С.¹, Толстолицкая Т.О.², Сергеев В.Г.^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

² ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Резюме. Малигнизация лимфопоза в лимфатических узлах (ЛУ) сопровождается структурной перестройкой лимфатических узлов и изменением характера гликозилирования мембранных и цитоплазматических белков. Для гистохимического выявления трансформирующихся лимфоидных клеток и ремоделируемой стромы лимфоузлов мы использовали лектин томата *Lycopersicon esculentum*, который способен связываться с поверхностными и цитоплазматическими гликопротеинами большинства клеточных элементов ЛУ. Целью исследования стало изучение особенностей архитектоники клеток с высоким уровнем гликозилирования белков в ЛУ пациентов с В-хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ). Материалом исследования послужили биоптаты надключичных и шейных ЛУ пациентов БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» с верифицированным диагнозом «В-ХЛЛ» (16 пациентов) в возрасте 49-73 лет, полученные до начала лечения, с их информированного добровольного согласия. Контрольными образцами послужили биоптаты ЛУ из этих же областей организма 12 лиц в возрасте 48-70 лет с реактивной гиперплазией лимфатических узлов. Парафиновые срезы ЛУ толщиной 7 мкм окрашивали с помощью ФИТЦ-конъюгированного ЛТ и флуоресцентного красителя йодид пропидия (ИП) и исследовали в микроскопе Nikon Eclipse E200, оснащенный люминесцентным блоком и цифровым фотоаппаратом. Анализ препаратов лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ свидетельствовал о значительных изменениях в гистотопографии клеток и внеклеточных структур с высоким уровнем гликозилирования. В частности, в кортикальном веществе фолликулы замещались массивом из малых лимфоцитов, на фоне которых выявлялись центры пролиферации с лимфоцитами с дисперсной упаковкой ИП-меченного хроматина. В этой

Адрес для переписки:

Сергеев Валерий Георгиевич
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный
университет»
426011, Удмуртская Республика, г. Ижевск,
ул. Холмогорова, 29, кв. 117.
Тел.: 8 (912) 465-73-39.
E-mail: cellbio@ya.ru

Address for correspondence:

Valery G. Sergeev
Udmurt State University
29 Kholmogorov St, Apt 117
Izhevsk, Udmurt Republic
Phone: +7 (912) 465-73-39.
E-mail: cellbio@ya.ru

Образец цитирования:

М.С. Аникаева, Т.О. Толстолицкая, В.Г. Сергеев
«Особенности гистотопографии лимфоцитов
и клеток стромы с высоким уровнем гликозилирования
в лимфатических узлах пациентов с В-хроническим
лимфолейкозом» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 4. С. 807-812.
doi: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

© Аникаева М.С. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.S. Anikaeva, T.O. Tolstolitskaya, V.G. Sergeev
“Histotopography of highly glycosylated lymphocytes and
stromal cells in lymph nodes of patients with B-chronic
lymphocytic leukaemia”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 4,
pp. 807-812.
doi: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

© Anikaeva M.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-НОН-16909

области мы также наблюдали равномерную сеть из тонких ЛТ-меченых ретикулярных волокон и большое количество кровеносных сосудов малого калибра. Макрофагподобные клетки, отчетливо идентифицируемые в ЦР фолликулов контрольных ЛУ, отсутствовали у пациентов с В-ХЛЛ. Однако отмечалось их повышенное число и интенсивность люминесцентного свечения относительно контроля в области, примыкающей к субкапсулярному синусу и в паракортикальной области вокруг коллагеновых тяжей, образующихся на основе кондуитов, а также вокруг соединительнотканых трабекул мозгового вещества. Обнаруженные отличия гистотопографии клеток ЛУ с высоким уровнем гликозилирования при В-ХЛЛ позволяют рассматривать предлагаемый способ окрашивания как информативный и облегчающий диагностирование этого заболевания при гистологическом исследовании.

Ключевые слова: лимфоциты, В-хронический лимфолейкоз, гликозилирование, лимфоузлы, строма лимфоузлов

HISTOTOPOGRAPHY OF HIGHLY GLYCOSYLATED LYMPHOCYTES AND STROMAL CELLS IN LYMPH NODES OF PATIENTS WITH B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

Anikaeva M.S.^a, Tolstolutsкая T.O.^b, Sergeev V.G.^{a, b}

^a Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

^b Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Abstract. Malignant transformation of lymphopoiesis in lymph nodes (LN) is accompanied by structural rearrangement of the LN stroma and changes in the glycosylation of membrane and cytoplasmic proteins. For the histochemical detection of transforming lymphoid cells and remodeled LN stroma, we used the tomato lectin *Lycopersicon esculentum*, which is able to bind to surface and cytoplasmic glycoproteins of the majority of LN cells. The study aimed to investigate the characteristics of cell architectonics with a high level of protein glycosylation in the LN of patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). The study material were biopsy specimens of supraclavicular and cervical LNs from patients of the First Republican Clinical Hospital of the Ministry of Health of the Udmurt Republic with a confirmed diagnosis of B-CLL (16 patients), aged 49-73 years, obtained prior to treatment with their informed voluntary consent. LN biopsies from the same body regions of 12 individuals aged 48-70 years with reactive LN hyperplasia served as control samples. Paraffin sections of 7 µm thick LN were stained with FITC-conjugated tomato lectin and fluorescent dye propidium iodide (IP) and examined using a Nikon Eclipse200 microscope equipped with a luminescence unit and digital camera. Analysis of LN preparations from patients with B-CLL revealed significant changes in the histotopography of cells and extracellular structures with a high degree of glycosylation. Follicles in the cortex were replaced by an array of small lymphocytes against a background of proliferating centers containing lymphocytes with dispersed packing of IP-labelled chromatin. In this area we also observed a uniform network of thin lectin-labelled reticular fibres and a large number of small blood vessels. Macrophage-like cells, clearly identifiable in the germinal centres of follicles in control, were absent in B-CLL. Their increased number and intensity of luminescence was observed in the subcapsular sinus area and in the paracortical area around collagen bundles formed by conduits, as well as around connective tissue trabeculae of the brain substance. The differences observed in the histological topography of highly glycosylated LN cells in B-CLL suggest that the proposed staining method is informative and facilitates the diagnosis of this disease in histological studies.

Keywords: lymphocytes, B-chronic lymphocytic leukaemia, glycosylation, lymph nodes, lymph node stroma

Введение

Малигнизация лимфопоеза в лимфатических узлах (ЛУ) ведет к их структурной перестройке и изменению динамики внутриузловых миграционных процессов, нарушающих в свою очередь процесс дифференцировки лимфоцитов, не подвергшихся трансформации [2]. Становится очевидным, что для диагностирования того или иного типа лимфом, помимо идентификации молекулярного цитофенотипа трансформированных лимфатических клеток, необходимо дополнительное описание перестроек стромы малигнизированных ЛУ. В связи с этим актуальной практической задачей становится поиск информативных и недорогих маркеров, позволяющих получать одновременно описание не только лимфоцитов на разных стадиях развития, но и гистотопографии стромы ЛУ.

В качестве одного из перспективных методических подходов, отвечающих поставленной задаче, может стать гистохимическое выявление внутриклеточных и мембранных, aberrантно гликозилированных белков при помощи растительных лектинов — олигомерных белков, которые специфически связывают моно- и олигосахариды, входящие в состав гликопротеинов и гликолипидов [4]. Гликозилирование рассматривается как один из наиболее распространенных и важных этапов посттрансляционных модификаций белков, характер которого влияет на фолдинг и взаимодействие с другими белками, и лежит в основе таких процессов, как адгезия, передача сигналов, клеточная дифференцировка и миграция [7]. При опухолевой трансформации меняется характер гликозилирования клеточных белков [9], ведущий к нарушениям межклеточной коммуникации и взаимодействию с матриксом, диссоциации и инвазии опухолевых клеток, опухолевому ангиогенезу и образованию метастазов [8].

Для гистохимического выявления стромальных и трансформированных лимфоидных клеток, на наш взгляд, перспективно использование лектина томата, который способен связываться с поверхностными гликопротеинами лимфоцитов [1], эндотелием капилляров [6], клетками макрофагальной линии [3] и опухолевыми клетками [5], т. е. может служить универсальным маркером для большинства клеточных элементов ЛУ.

Целью нашего исследования стало описание гистотопографической организации клеток с вы-

соким уровнем гликозилирования в лимфатических узлах пациентов с В-хроническим лимфолейкозом (В-ХЛЛ) в сравнении с контролем, в качестве которого исследовались лимфатические узлы с реактивной гиперплазией.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили биоптаты надключичных и шейных лимфоузлов пациентов БУЗ УР «Первая республиканская клиническая больница МЗ УР» с верифицированными диагнозами «В-ХЛЛ» (16 пациентов) в возрасте 49-73 лет, полученные до начала лечения, с информированного добровольного согласия пациентов. Контрольную группу составили биоптаты лимфатических узлов 12 лиц в возрасте 48-70 лет с реактивной гиперплазией лимфатических узлов. Биоптаты лимфатических узлов фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Отмывка от фиксатора, обезвоживание в батарее спиртов восходящей концентрации и пропитывание парафином проводили по общепринятой стандартной методике. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм монтировали на предметные стекла и после депарафинизации в ксилоле и проведения по батарее спиртов нисходящей концентрации окрашивали лектином томата *Lycopersicon esculentum*, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) (1:500; Sigma-Aldrich, США). Препараты заключали в среду, содержащую флуоресцентный краситель йодид пропидия (ИП), позволяющий визуализировать гетерохроматин ядер (Abscam, Великобритания). Гистологические препараты изучали в микроскопе Nikon Eclipse E200, оснащенный люминесцентным блоком и фотоприставкой MicroPublisher 3.3 RTV (QImaging, Канада).

Результаты и обсуждение

Окрашивание гистологических срезов узлов с В-ХЛЛ и реактивной гиперплазией ФИТЦ-конъюгированным лектином томата и йодидом пропидия позволило обнаружить характерные особенности архитектонической организации малигнизированных ЛУ, отличающие их от контрольных, реактивно гиперплазивных ЛУ. У пациентов контрольной группы выявленные нами изменения в строении ЛУ не отличались от допустимых норм. Окраска ФИТЦ-конъюгированным лектином томата позволила

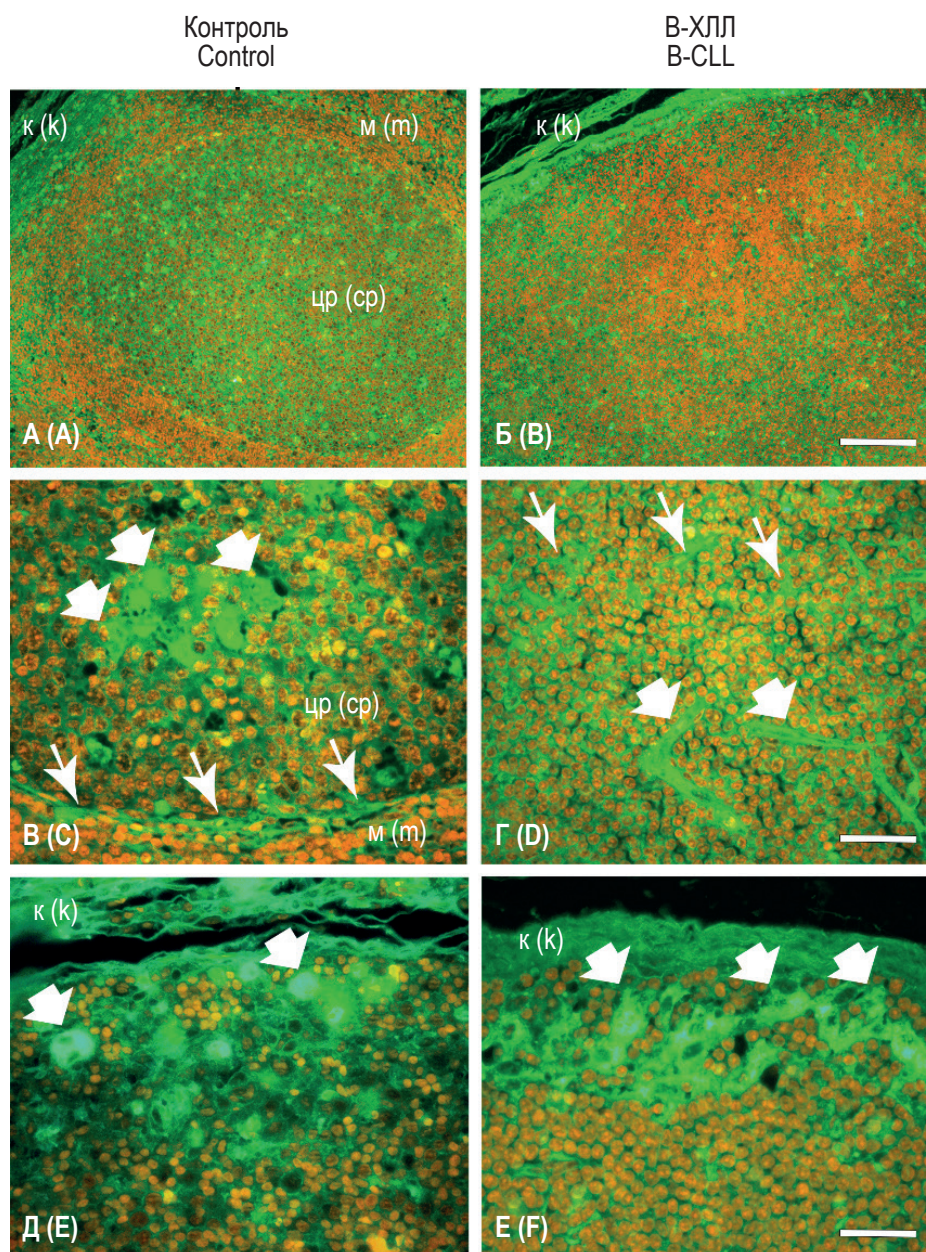


Рисунок 1. Клетки и внеклеточные элементы стромы лимфатических узлов пациентов с реактивной гиперплазией (контроль) и В-хроническим лимфолейкозом, окрашенные ФИТЦ-конъюгированным лектином томата (зеленое окрашивание) и йодидом пропидия (красное окрашивание)

Примечание. А – фолликул в кортексе лимфоузла. Обозначения: к – капсула; цр – центр размножения; м – мантия. Б – кортекс лимфоузла. Обозначения: к – капсула. Увеличения для А и Б: ок. 10 \times . Длина масштабного отрезка = 500 мкм. В – фрагмент фолликула. Обозначения: цр – центр размножения; м – мантия; толстые стрелки – макрофагоподобные клетки; тонкие стрелки – ретикулярные клетки и волокна на границе мантии и центра размножения; Г – фрагмент кортекса. Обозначения: тонкие стрелки – ретикулярные клетки и волокна; толстые клетки – кровеносные сосуды. Увеличения для В и Г: ок. 40 \times . Длина масштабного отрезка = 90 мкм. Д, Е – макрофагоподобные клетки в субкапсулярной зоне (выделены стрелками). Обозначения: к – капсула. Ув: ок. 40 \times . Длина масштабного отрезка = 80 мкм.

Figure 1. Cells and extracellular elements of lymph node stroma of patients with reactive hyperplasia (control) and B-chronic lympholeukaemia stained with FITC-conjugated tomato lectin (green staining) and propidium iodide (red staining)

Note. A, follicle in lymph node cortex. Notations: k, capsule; cp, germinal centre; m, mantle. B, cortex of lymph node. Notations: k, capsule. Magnifications for A and B: ocular 10 \times . Scale length = 500 μ m. C, follicle fragment. Notations: cp, germinal centre; m, mantle; thick arrows, macrophage-like cells; thin arrows, reticular cells and fibres at the border of mantle and germinal centre; G, cortex fragment. Notations: thin arrows – reticular cells and fibres; thick arrows, blood vessels. Magnifications for C and D: ocular 40 \times . Scale length = 90 μ m. E, F, macrophage-like cells in the subcapsular zone (highlighted by arrows). Notations: k, capsule. Magnifications: 40 \times . Scale length = 80 μ m.

выявить капсулу органа из плотных коллагеновых волокон и небольшого числа фиброцитов (рис. 1А). От субкапсулярного краевого синуса до глубокой коры отходили коллагеновые пучки, образующие межфолликулярные трабекулы. В области фолликулов пучки коллагеновых волокон изгибались по контуру центров размножения (ЦР) фолликулов, образуя вместе с ретикулярными клетками своеобразную «капсулу» на границе между ЦР и мантией (рис. 1В). Кортикальная зона была расширена, содержала лимфоидные фолликулы различного размера (рис. 1А). Центры размножения (ЦР) фолликулов состояли из лимфоидных клеток на разных этапах развития, о чем свидетельствовали отличия не только в площади клеток, но и в плотности упаковки и распределении в ядре меченого ИП гетерохроматина. Крупные параиммунобласты, центробласты и центроциты характеризовались последовательно нарастающим количеством в ядрах люминесцирующего продукта, тогда как зрелые лимфоциты, образующие мантию фолликулов, имели яркое свечение плотноупакованного гетерохроматина. В субкапсулярной зоне (СЗ) и ЦР обращали на себя клетки с большой площадью цитоплазмы, имевшие неправильную или отросчатую форму, соответствующие по внешнему виду клеткам макрофагальной линии (рис. 1Д). Примечательно, что в цитоплазме макрофагopodobных клеток ЦР, в отличие от таковых в СЗ, обнаруживались включения различного размера, часто окрашиваемые ИП, что свидетельствует о высокой фагоцитарной активности этих клеток.

Анализ препаратов лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ, свидетельствовал о значительных изменениях в гистотопографии клеток и внеклеточных структур с высоким уровнем гликозилирования. Паренхима коркового слоя лимфоузлов содержала небольшое количество остаточных герминативных центров и в основном была заполнена массивом из малых лимфоцитов с круглыми ядрами с плотным, интенсивно окрашенным хроматином (рис. 1Б). На их фоне выявлялись менее окрашенные центры пролиферации (ЦП) с лимфоцитами большего размера и менее плотной упаковкой ИП-меченого хроматина. Кортикальная область характеризовалась наличием дезорганизованной сети из тонких ретикулярных волокон и клеток, а также большим количеством кровеносных сосудов малого калибра (рис. 1Г). Макрофагподобные клетки в этой

области отсутствовали, но обращает на себя внимание их повышенное количество и степень люминесцентного свечения относительно контроля в субкапсулярной области (рис. 1Е). За счет контактирующих отростков они образовывали своеобразную сеть на границе краевого синуса и паренхимы ЛУ. Такая же плотная сеть из контактирующих макрофагподобных клеток окружала утолщенные пучки правильно ориентированных коллагеновых волокон, образующих трабекулы в паракортикальной области и мозговой области ЛУ. Наличие таких трабекул служило отличительной чертой ЛУ пациентов с В-ХЛЛ.

Заключение

Окрашивание биоптатов ЛУ при помощи ФИТЦ-конъюгированного лектина с докраской гетерохроматина йодидом пропидия позволяет получать четкую гистологическую картину структурной организации ключевых регуляторных элементов лимфопоеза – фолликулярных макрофагподобных клеток, ретикулярных клеток, сосудов микроциркуляции и ретикулярной стромы. Наблюдаемая картина значительно превосходит по информативности стандартную, получаемую при окраске гистологических срезов рутинными красителями, такими как гематоксилин и эозин, и может быть рекомендована для проведения качественной диагностики патологических процессов в лимфатических узлах.

Обнаруженная при помощи предлагаемого гистохимического окрашивания патологическая микроархитектура лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ свидетельствует о нарушениях в них пространственно организованных взаимодействий между патрулирующими лимфоцитами, фибробластами и антигенпрезентирующими макрофагами, которые необходимы для эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Ремоделирование стромы ЛУ может свидетельствовать о вовлеченности стромальных элементов в генез ХЛЛ и/или в процесс избегания малигнизированными клетками иммунного надзора. Поскольку при В-ХЛЛ все эти структуры экспрессируют гликаны на высоком уровне, логично полагать, что последние вовлечены в молекулярные механизмы малигнизированного лимфопоеза и могут в будущем рассматриваться в качестве терапевтической мишени для лечения злокачественных новообразований.

Список литературы / References

1. Blöchl C., Wang D., Mayboroda O.A., Lageveen-Kammeijer G.S.M., Wuhler M. Transcriptionally imprinted glycomic signatures of acute myeloid leukemia. *Cell Biosci.*, 2023, Vol. 13, no. 1, 31. doi: 10.1186/s13578-023-00981-0.
2. Cerreto M., Foà R., Natori A. The role of the microenvironment and cell adhesion molecules in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*, 2023, Vol. 15, no. 21, 5160. doi: 10.3390/cancers15215160.
3. Chaves Filho A.J.M., Jucá P.M., Soares M.V.R., de Oliveira C.A., de Sousa R.C., Lós D.B., Russo R.C., Yaochite J.N.U., Macedo D.S. In vitro immunogenic profile of recombinant SARS-CoV2 S1-RBD peptide in murine macrophage and microglial cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2023, Vol. 118, e220144. doi: 10.1590/0074-02760220144.
4. de Sousa G.F., Lund R.G., da Silva Pinto L. The Role of plant lectins in the cellular and molecular processes of skin wound repair: an overview. *Curr. Pharm. Des.*, 2023, Vol. 29, no. 33, pp. 2618-2625.
5. Godinho-Pereira J., Vaz D., Figueira I., Aniceto-Romão J., Krizbai I., Malhó R., Rocha J., Carvalheiro M.C., Simões S., Gaspar M.M., Brito M.A. Breast cancer brain metastases: implementation and characterization of a mouse model relying on malignant cells inoculation in the carotid artery. *Cells.*, 2023, Vol. 12, no. 16, 2076. doi: 10.3390/cells12162076.
6. Jiao C., Adler K., Liu X., Sun W., Mullins R.F., Sohn E.H. Visualization of mouse choroidal and retinal vasculature using fluorescent tomato lectin perfusion. *Transl. Vis. Sci. Technol.*, 2020, Vol. 9, no. 1, 1. doi: 10.1167/tvst.9.1.1.
7. Reily C., Stewart T.J., Renfrow M.B., Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2019, Vol. 15, pp. 346-366.
8. Su H., Wang M., Pang X., Guan F., Li X., Cheng Y. When glycosylation meets blood cells: a glance of the aberrant glycosylation in hematological malignancies. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2021, Vol. 180, pp. 85-117.
9. Suzuki O. Glycosylation in lymphoma: Biology and glycotherapy. *Pathol. Int.*, 2019, Vol. 69, no. 8, pp. 441-449.

Авторы:

Аникаева М.С. — аспирант кафедры физиологии, клеточной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Толстоуцкая Т.О. — к.м.н., доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Сергеев В.Г. — д.б.н., заведующий кафедрой физиологии, клеточной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»; заведующий экспериментально-учебной лабораторией ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», г. Ижевск, Удмуртская Республика, Россия

Authors:

Anikaeva M.S., Postgraduate Student, Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Tolstolutskaia T.O., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Sergeev V.G., PhD, MD (Biology), Head, Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University; Head, Experimental and Educational Laboratory, Izhevsk Medical Academy, Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation

Поступила 03.04.2024
Отправлена на доработку 04.04.2024
Принята к печати 12.04.2024

Received 03.04.2024
Revision received 04.04.2024
Accepted 12.04.2024