

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

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

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

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

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ СТРОМЫ ЛИМФОУЗЛОВ
GLYCOSYLATION OF LYMPH NODE STROMA

10.46235/1028-7221-16909-НОИ

**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}

^aUdmurt State University, Izhevsk, Russia.

^bIzhevsk Medical Academy, Izhevsk, Russia.

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 Eclipse200, 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 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.

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.

1 Введение

Малигнизация лимфопоэза 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 [1]. 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, аберрантно гликозилированных белков при помощи растительных лектинов - олигомерных белков, которые специфически связывают моно- и олигосахариды, входящих в состав гликопротеинов и гликолипидов [2]. 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 [3]. При опухолевой трансформации меняется характер гликозилирования клеточных белков [4], ведущий к нарушениям межклеточной коммуникации и взаимодействию с матриксом, диссоциации и инвазии опухолевых клеток, опухолевому ангиогенезу и образованию метастазов [5].

Для гистохимического выявления стромальных и трансформированных лимфоидных клеток, на наш взгляд, перспективно использование лектина томата, который способен связываться с поверхностными гликопротеинами лимфоцитов [6], эндотелием капилляров [7], клетками макрофагальной линии [8] и опухолевыми клетками [9] т.е. может служить универсальным маркером для большинства клеточных элементов ЛУ.

Целью нашего исследования стало описание гистотопографической организации клеток с высоким 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.

2 Материал 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

45 составили биоптаты лимфатических узлов 12 лиц в возрасте 48-70 лет с
46 реактивной гиперплазией лимфатических узлов. Биоптаты лимфатических
47 узлов фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Отмывка от
48 фиксатора, обезвоживание в батарее спиртов восходящей концентрации и
49 пропитывание парафином проводили по общепринятой стандартной
50 методике. Парафиновые срезы толщиной 7 мкм монтировали на предметные
51 стекла и после депарафинизации в ксилоле и проведения по батарее спиртов
52 нисходящей концентрации окрашивали лектином томата *Lycopersicon*
53 *esculentum*, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ)
54 (1:500; Sigma-Aldrich, USA). Препараты заключали в среду, содержащую
55 флуоресцентный краситель йодид пропидия (ИП), позволяющий
56 визуализировать гетерохроматин ядер (Abcam, UK). Гистологические
57 препараты изучали в микроскопе Nikon Eclipse200, оснащенным
58 люминесцентным блоком и фотоприставкой MicroPublisher 3.3 RTV
59 (QImaging, Canada).

60 3 Результаты

61 Окрашивание гистологических срезов узлов с В-ХЛЛ и реактивной
62 гиперплазией ФИТЦ-конъюгированным лектином томата и йодидом
63 пропидия позволило обнаружить характерные особенности
64 архитектурной организации малигнизированных ЛУ, отличающие их от
65 контрольных, реактивно гиперплазивных ЛУ. У пациентов контрольной
66 группы выявленные нами изменения в строении ЛУ не отличались от
67 допустимых норм. Окраска ФИТЦ-конъюгированным лектином томата
68 позволила выявить капсулу органа из плотных коллагеновых волокон и
69 небольшого числа фиброцитов (**рис.1а**). От субкапсулярного краевого синуса
70 до глубокой коры отходили коллагеновые пучки, образующие
71 межфолликулярные трабекулы. В области фолликулов пучки коллагеновых
72 волокон изгибались по контуру центров размножения (ЦР) фолликулов,
73 образуя вместе с ретикулярными клетками своеобразную «капсулу» на
74 границе между ЦР и мантией (**рис.1в**). Кортикальная зона была расширена,
75 содержала лимфоидные фолликулы различного размера (**рис.1а**). Центры
76 размножения (ЦР) фолликулов состояли из лимфоидных клеток на разных
77 этапах развития, о чем свидетельствовали отличия не только в площади
78 клеток, но и в плотности упаковки и распределении в ядре меченого ИП
79 гетерохроматина. Крупные параиммунобласты, центробласты и центроциты
80 характеризовались последовательно нарастающим количеством в ядрах
81 люминесцирующего продукта, тогда как зрелые лимфоциты, образующие
82 мантию фолликулов, имели яркое свечение плотноупакованного
83 гетерохроматина. В субкапсулярной зоне (СЗ) и ЦР обращали на себя клетки
84 с большой площадью цитоплазмы, имевшие неправильную или отросчатую
85 форму, соответствующие по внешнему виду клеткам макрофагальной линии
86 (**рис.1д**). Примечательно, что в цитоплазме макрофагподобных клеток ЦР в
87 отличие от таковых в СЗ обнаруживались включения различного размера,

88 часто окрашиваемые ИП, что свидетельствует о высокой фагоцитарной
89 активности этих клеток.

90 Анализ препаратов лимфатических узлов пациентов с В-ХЛЛ,
91 свидетельствовал о значительных изменениях в гистотопографии клеток и
92 внеклеточных структур с высоким уровнем гликозилирования. Паренхима
93 коркового слоя лимфоузлов содержала небольшое количество остаточных
94 герминативных центров и, в основном, была заполнена массивом из малых
95 лимфоцитов с круглыми ядрами с плотным, интенсивно окрашенным
96 хроматином (**рис 1б**). На их фоне выявлялись менее окрашенные центры
97 пролиферации (ЦП) с лимфоцитами большего размера и менее плотной
98 упаковкой ИП-меченного хроматина. Кортикальная область характеризовалась
99 наличием дезорганизованной сети из тонких ретикулярных волокон и клеток,
100 а также большим количеством кровеносных сосудов малого калибра (**рис.1г**).
101 Макрофагподобные клетки в этой области отсутствовали, но обращает на себя
102 внимание их повышенное количество и степень люминесцентного свечения
103 относительно контроля в субкапсулярной области (**рис. 1е**). За счет
104 контактирующих отростков они образовывали своеобразную сеть на границе
105 краевого синуса и паренхимы ЛУ. Такая же плотная сеть из контактирующих
106 макрофагподобных клеток окружала утолщенные пучки правильно
107 ориентированных коллагеновых волокон, образующих трабекулы в
108 паракортикальной области и мозговой области ЛУ. Наличие таких трабекул
109 служило отличительной чертой ЛУ пациентов с В-ХЛЛ.

110 4 Заключение

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

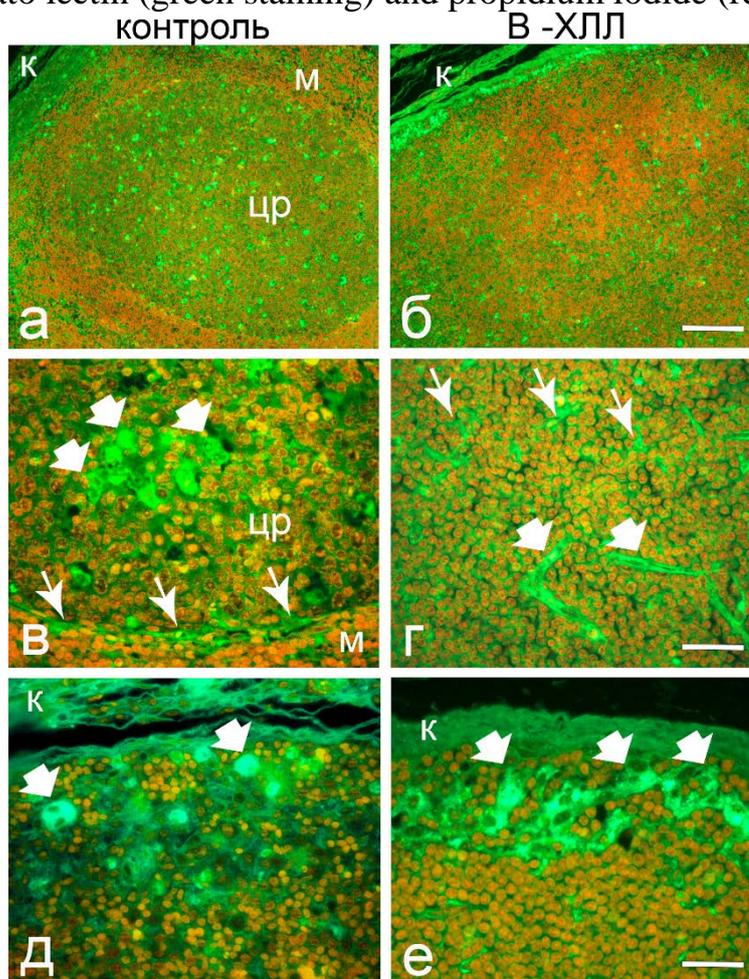
121 Обнаруженная при помощи предлагаемого гистохимического
122 окрашивания патологическая микроархитектура лимфатических узлов
123 пациентов с В-ХЛЛ свидетельствует о нарушениях в них пространственно
124 организованных взаимодействий между патрулирующими лимфоцитами,
125 фибробластами и антигенпрезентирующими макрофагами, которые
126 необходимы для эффективного противоопухолевого иммунного ответа.
127 Ремоделирование стромы ЛУ может свидетельствовать о вовлеченности
128 стромальных элементов в генез ХЛЛ и/или в процесс избегания
129 малигнизированными клетками иммунного надзора. Поскольку при В-ХЛЛ
130 все эти структуры экспрессируют гликаны на высоком уровне, логично
131 полагать, что последние вовлечены в молекулярные механизмы

132 малигнизированного лимфопоза и могут в будущем рассматриваться в
133 качестве терапевтической мишени для лечения злокачественных
134 новообразований.

РИСУНКИ

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).

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).



Примечания: 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. 10х. Длина масштабного отрезка = 500 мкм. в – фрагмент фолликула. Обозначения: цр – центр размножения; м – мантия; толстые стрелки – макрофагподобные 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. 40х. Длина масштабного отрезка = 90 мкм. д, е – макрофагподобные клетки в субкапсулярной зоне (выделены стрелками). Обозначения: к – капсула. Ув: ок.40х; Длина масштабного отрезка = 80 мкм. conjugated tomato lectin (green staining) and propidium iodide (red staining).

Notes: 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 10x. Scale length = 500µm. 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 40x. Scale length = 90µm. e, f - macrophage-like cells in the subcapsular zone (highlighted by arrows). Notations: k - capsule. Magnifications: 40x; Scale length = 80µm.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Аникаева М. С. – аспирант ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии;

Адрес: 426011, г. Ижевск, ул. Холмогорова, 29-117;

телефон: 8(912)465-73-39;

e-mail: cellbio@ya.ru

Anikaeva M. S. – graduate student of the Udmurt State University, Izhevsk;

telephone: 8(912)465-73-39;

e-mail: cellbio@ya.ru

Блок 2. Информация об авторах

Толстолуцкая Т. О. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики;

адрес: 426004, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 216б-129;

телефон: 8(912)854-08-80;

e-mail: ttolstolutskaya@yandex.ru

Tolstolutskaya T. O. – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Izhevsk Medical Academy;

telephone: 8(912)854-08-80;

e-mail: ttolstolutskaya@yandex.ru

Сергеев В. Г. – доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии, клеточной биологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», заведующий экспериментально-учебной лаборатории ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии Удмуртского государственного университета, экспериментально-учебная лаборатория Ижевской медицинской академии;

адрес: 426011, г. Ижевск, ул. Холмогорова, 29-117;

телефон: 8(912)465-73-39;

e-mail: cellbio@ya.ru

Sergeev V. G. – Doctor of Biological Sciences, Head of the Department of Physiology, Cell Biology and Biotechnology, Udmurt State University Izhevsk

telephone: 8(912)465-73-39;

e-mail: cellbio@ya.ru

Блок 3. Метаданные статьи

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

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

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ СТРОМЫ ЛИМФОУЗЛОВ
GLYCOSYLATION OF LYMPH NODE STROMA

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

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

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 1.

03.04.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1	Cerreto M., Foà R., Natoni A. The role of the microenvironment and cell adhesion molecules in chronic lymphocytic leukemia. <i>Cancers (Basel)</i> ., 2023, Vol. 15, no. 21, pp. 5160.	-	[10.3390/cancers15215160]
2	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. <i>Curr Pharm Des.</i> 2023, Vol. 29, no. 33, pp. 2618-2625.	-	[10.2174/0113816128264103231030093124]
3	Reily C., Stewart T. J., Renfrow M. B., Novak J. Glycosylation in health and disease. <i>Nat. Rev. Nephrol.</i> , 2019, Vol. 15, pp. 346–366.	-	[10.1038/s41581-019- 0129-4]
4	Suzuki O. Glycosylation in lymphoma: Biology and glycotherapy. <i>Pathol Int.</i> , 2019, Vol. 69, no. 8, pp. 441-449.	-	[10.1111/pin.12834]
5	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. <i>Rev Physiol Biochem Pharmacol.</i> , 2021, Vol. 180, pp. 85-117.	-	[10.1007/112_2021_60]

6	Blöchl C., Wang D., Mayboroda O.A., Lageveen-Kammeijer G.S.M., Wuhrer M. Transcriptionally imprinted glycomic signatures of acute myeloid leukemia. <i>Cell Biosci.</i> , 2023, Vol. 13, no. 1, pp.31.	-	[10.1186/s13578-023-00981-0]
7	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. <i>Transl Vis Sci Technol.</i> , 2020, Vol. 9, no. 1 pp. 1.	-	[10.1167/tvst.9.1.1]
8	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. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz.</i> , 2023, Vol. 118, e220144.	-	[10.1590/0074-02760220144]
9	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	-	[10.3390/cells12162076]

	model relying on malignant cells inoculation in the carotid artery. Cells., 2023, Vol. 12, no. 16, pp. 2076.		
--	--	--	--